

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2002年10月24日(24.10.02)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 02/83738 A1

(51) 国际分类号⁷: C07K 16/18, A61K 39/395, C12N 15/13, A61P 35/00

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00252

(22) 国际申请日: 2002年4月10日(10.04.02)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
01110554.2 2001年4月11日(11.04.01) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 中国科学院遗传学研究所(INSTITUTE OF GENETICS, CAS) [CN/CN]; 中国北京市安外大屯路, Beijing 100101 (CN). 北京安波特基因工程技术有限公司(BEIJING ABT GENETIC ENGINEERING TECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市上地东里六区 10 号楼 518 室, 100085 (CN).

(72) 发明人;及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 黄华裸(HUANG, Hua-Liang) [CN/CN]; 程巨龙(CHENG, Ju-Long) [CN/CN]; 王祥斌(WANG, Xiang-Bin) [CN/CN]; 宋利萍(SONG, Li-Ping) [CN/CN]; 张众(ZHANG, Zhong) [CN/CN]; 林晴(LIN, Qing) [CN/CN]; 顾莹(GU, Ying) [CN/CN]; 中国北京市安外大屯路, Beijing 100101 (CN).

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限责任公司(CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD); 中国北京市海淀区海淀路80号中科大厦16层, Beijing 100080 (CN).

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: CYCLIC SINGLE STRAND TRISPECIFIC ANTIBODY

(54) 发明名称: 环状单链三特异抗体

(57) Abstract: The invention provides a cyclic single strand trispecific anti-tumor antibody. The antibody is combined by anti-tumor Fab, single strand antibody and modified anti-human CD3 or CD28 Fab. The present invention also provided the DNA sequence that codes for the antibody. The expression vector containing the DNA and the corresponding host cell containing the vector are also disclosed.

(57) 摘要

本发明提供了一种抗人肿瘤的环状单链三特异抗体, 它是由抗肿瘤的 Fab、单域抗体或单链抗体, 改形抗人 CD3 的 Fab、单域抗体或单链抗体以及改形抗人 CD28 的 Fab、单域抗体或单链抗体连接而成的。本发明还提供了编码这种抗体的 DNA 序列, 含有这种 DNA 序列的表达载体和含有这种表达载体的宿主细胞。

WO 02/83738 A1

环状单链三特异抗体

技术领域

本发明涉及一种基因工程环状单链三特异抗体，编码这种抗体的 DNA 序列，
5 含有所述序列的表达载体和含有这种表达载体的宿主细胞。

背景技术

三特异抗体的构建基于在同一个分子上引进三个不同的抗原结合部位。构建时所选用的抗体基因不同，从而产生不同的生物学功能。已报道的三特异抗体的构建主要采用化学嵌合方法，杂交瘤细胞进一步杂交或通过融合基因表达而制得；其中各抗体大都采用抗体 Fab 片段或在三个抗体中只有一个抗体采用单链抗体小片段
10 (Fay TN 等, 1988; Tutt A 等, 1991; Jung G 等, 1991; Schott ME 等, 1993; French RR, 1998; Somasundaram C 等, 1999; Schoonjans R 等, 2000a; Schoonjans R 等, 2000b; Wong WM 等, 2000)。

15 本发明的环状单链三特异抗体的构建是基于在肿瘤免疫治疗中起主要作用的 T 细胞需要双重信号激活而设计的一种新型工程抗体。在肿瘤的免疫治疗中，以 T 细胞为主的细胞免疫起主要作用。T 细胞的激活需要双重信号，第一信号由 TCR-CD3 复合体提供，与抗原特异性相关；第二信号为 APC 表面的多个辅助刺激分子提供的共刺激信号。CD3 由 5 种不同的肽链构成，CD3 与 TCR 呈非共价键结合，形成完整的
20 TCR-CD3 复合物，共同参与对抗原刺激的免疫应答。如果只有第一信号而没有共刺激信号刺激可导致 T 细胞的无能甚至凋亡。共刺激信号没有抗原特异性，亦不受 MHC 限制，但可介导细胞因子分泌，T 细胞增殖及效应功能的发挥。CD28 是 T 细胞最主要的一个共刺激信号接受体，在 T 细胞共刺激信号受体中如 CD2, CD4, CD8 等，只有 CD28 可以阻止诱导 T 细胞产生无能(Slavik et al. 1999)。根据这些特点，可以利用
25 抗 CD3 抗体和抗 CD28 抗体分别作为它们的配体而起激活 T 细胞的作用。随着抗体工程技术的不断发展，尤其是基因工程技术在抗体改造上的应用，使得人们可以根据需要对抗体进行改造以更利于应用。目前，已根据抗体的靶向性，构建了既针对肿瘤细胞又可以激活效应细胞的双特异抗体，双特异单链抗体等。

采用基因工程制备的抗体在肿瘤免疫治疗研究报道中，基于抗肿瘤相关抗原
30 (TAA)抗体与抗 CD3 抗体或抗 CD28 抗体构成的双特异抗体(BsAb)或单克隆抗体

(McAb)的研究报道较多。早期 BsAb 用于肿瘤免疫治疗的临床试验为单独连接触发分子 TCR-CD3 和 TAA, 发现效果不佳, 可出现活化的 T 细胞克隆无能和凋亡, 后来采用 IL-2 或丝裂原植物凝集素 (Lectin) 作为共刺激因子在体外予刺激活化 T 细胞的方法取得一定的效果。随着双信号识别理论的确立以及 CD28 分子的深入研究, 发现抗 CD28 McAb 可以同 B7 家族一样传递共刺激信号, 协同抗 CD3/TAA 触发 T 细胞的充分活化。Demanet 等(1996)用抗 CD3/Id BsAb 加抗 CD28 McAb 对 BCL1 淋巴瘤的 Balb/C 小鼠模型多次注射, 可使负荷 10^5 个细胞的淋巴瘤消退, 其疗效较单独使用 BsAb 提高了 20 倍, 而 BsAb 的用量仅为单独使用的 1/10。Bohlen 等(1997)用抗 CD3/CD19 BsAb 和抗 CD28 McAb 介导自体 T 细胞治疗人类慢性 B 淋巴细胞白血病的 SCID 小鼠模型, 得到较好的肿瘤抑制效果, 且具有预防复发的价值。进一步的研究是将抗 CD3 和抗 CD28 BsAb 共同使用以增强肿瘤的特异性, 如 Renner 等(1994)将抗 CD3/CD30 和抗 CD28/CD30 两种 BsAb 联合使用, 治疗人何杰金氏淋巴瘤的 SCID 小鼠取得良好效果。Mazzoni 等(1996)将抗 CD3×抗 FBP(卵巢癌 TAA)和抗 CD28×抗 FBP 两种双特异抗体同时使用, 体外杀伤实验表明, 双重信号能有效的激活 CD8⁺T 细胞, 对带有 FBP 的卵巢癌细胞特异地杀伤。Manzke 等(1999)将 CD3×CD19 双特异抗体和 CD28 双价抗体联合使用, 在治疗 B 细胞介导的淋巴细胞癌中, 比单独使用 CD3×CD19 双特异抗体效果明显。BsAb 在实体瘤的治疗上也取得明显效果, Grosse-Hovest 等(1999)发现抗 CD3/tumor BsAb 在与 B16 黑色素瘤细胞共育的肺癌细胞小鼠模型中有明显的治疗作用, 抗 CD28 BsAb 的合用可明显地提高对肿瘤细胞的攻击率, 且在静脉注射 BsAb 治疗过的小鼠中用肿瘤细胞再次攻击, 长期存活的数量明显提高, 表明 BsAb 可诱导小鼠产生长期的保护免疫。因此, 如果将抗肿瘤相关抗原抗体, 抗 CD3 抗体及抗 CD28 抗体的基因融合表达, 可以在更有效激活效应细胞, 提高肿瘤的治愈率的同时, 大大简化生产工艺流程, 提高生产效率, 降低生产成本。然而, 如果简单地将这三种抗体串联成线状分子, 不利于在体内运输, 而且不稳定。为了解决这一问题, 本发明用抗体铰链区片段将这一分子环化, 构建成环状单链三特异抗体。

鼠源抗体在治疗中也存在许多需要解决的问题, 特别是鼠源抗体的异源性引起病人产生 HAMA (human anti-mouse immunoglobulin antibodies)反应, 加快了抗体的清除, 封闭其治疗效果, 并引起过敏反应。目前很难制备人源单克隆抗体, 因此对鼠源抗体进行人源化改造, 是充分发挥鼠源抗体在肿瘤治疗中应用的可选择途径。抗

体人源化的分子基础是抗体具有清晰的结构与功能域。这个 Y-字型的分子具有两条相同的重链和轻链，每一条链由一个可变区(variable region)和一个或多个恒定区(constant region)组成，可变区主要负责与抗原结合，恒定区主要负责结合效应分子。在每一个可变区内有三个在序列和晶体结构上都高度变化的柔性环区(loop)，它们主要负责抗原的识别，被称为互补决定区(complementarity-determining regions, CDRs)，而可变区的其余部分相对稳定，由较为刚性的 β -折叠(β -sheet) 组成，被称为框架区(framework regions, FRs)。CDRs 与 FRs 间隔排列而形成“三明治”结构。重链和轻链及两条重链之间均以二硫键相连。抗体的这种结构相对保守，有利于应用蛋白质工程对抗体分子加以改造，以达到保持抗原结合位点特异性和有效引发效应功能的同时，最大程度地降低免疫原活性并发挥抗体的临床治疗作用。第一代人源化抗体是嵌合抗体，由鼠源抗体可变区和人源抗体的恒定区组成。有数据表明，嵌合抗体有效地提高了药物动力学系数并明显降低了免疫原性，一些嵌合抗体已成功地进入临床实验。但经反复用药仍有一半以上的病人产生了抗鼠源可变区抗体。第二代人源化抗体被称作 CDR-移植抗体(CDR-grafted antibody)或改形抗体，即将鼠源 CDRs 移植到人源抗体框架内，这就在保留鼠源抗体的抗原结合特异性基础上，较嵌合抗体进一步人源化。实际上，同一个人源框架可植入不同的鼠源 CDRs，而生成多种不同序列的改形抗体。然而，简单将鼠源 CDRs 移植到人源抗体的 FRs 中，常常导致人源化抗体的免疫学活性下降甚至消失。因此要考虑 CDRs 和 FRs 氨基酸残基之间的相互作用，对维持抗体空间结构的鼠源 FRs 中个别氨基酸残基必须予以保留。例如：从抗人淋巴细胞表面抗原的鼠源单抗出发构建改形抗体时，仅仅将 CDRs 进行移植并不能得到与原抗原相结合的活性，用计算机模拟 V_H CDRs 与 FRs 时发现 FR1 的 Phe27 与 CDR1 密切接触，而人源框架中的相应位置为 Ser27。当把 Ser27 诱变为 Phe27 后，改形抗体获得了原抗原与抗体的结合活性。实际上，一些改形抗体在进行个别氨基酸残基诱变后，亲和力可以提高三倍。CAMPATH-1H 是进入临床的第一个改形抗体，在治疗非何杰金(non-Hodgkin)淋巴瘤和类风湿关节炎中取得了良好效果。类似的还有 HuRSV-19,D1.3VHFNS/VK。残基替换的一般策略是，选择与鼠源 FRs 同源性最高的人源序列作为构建改形抗体的框架，参照已知可变区的晶体结构及所属抗体家族的保守序列，在计算机的辅助下建立分子模型，进行取舍。残基替换在提高亲和力的同时，也增加了异源性，因此，在改形抗体的构建中，应权衡二者，优化组合。在环形三特异抗体的构建中，我们采用了由本实验室构建筛选的

改形抗 CD3 的单链抗体和改形抗 CD28 V_H 单域抗体, 这为环形三特异抗体降低鼠源性
性及进一步临床应用奠定了基础。

在环形三特异抗体的构建中, 连接不同抗体基因的域间连接肽 (Interlinker) 的选用十分重要, 它关系到所构建的抗体是否成功。本发明中分别采用了人免疫球
5 蛋白 IgG 的 Fc 片段, 人血清白蛋白 HSA 的片段以及人免疫球蛋白 IgG3'CL 的铰链
区片段; 同时在各个连接肽与抗体基因片段之间加入具有柔韧性的短肽 Gly₄Ser, 这为各
抗体在空间的正确折叠提供了条件。**Interlinker Fc:** 小分子抗体在应用中的主要问题
是, 由于缺少 Fc, 不能引发效应功能。有研究表明, 在人 IgG 四种亚类中, IgG1 引
发 ADCC 和 CDC 的能力最强。它通过 CH2 C 端的一段序列与 C1q 结合, 引发补体
10 的经典激活途径, 其中 Glu318, Lys320 及 Lys322 在空间构象上靠近成簇, 位于 Fc
分子表面, 直接与 C1q 结合。在对 Fc 引发效应功能的作用方式的研究中发现, 尽管
糖基化不影响抗原抗体的结合, 但却对 Fc 引发的 ADCC 及 CDC 至关重要。IgG 的
糖基化位点在 CH2 的 Asn297 上。因此, 本研究选择人 IgG1 CH2 中 297-322 长 26aa
的片段, 包含糖基化位点 Asn297, C1q 结合位点 Glu238, Lys320 及 Lys322, 作为 scBsAb
15 载体构建中的一种 interlinker, 使 scBsAb 具有类似 Fc 引发 CDC 效应的功能。
Interlinker HSA: 小分子抗体在应用中的另一个问题是, 在血清中的半衰期短, 易被
清除。这些虽有利于免疫诊断和中和毒素, 却不利于发挥治疗作用。HSA 广泛分布
于人体的各个部分, 在血液中非常丰富, 是最主要的血清蛋白。它主要经肝脏缓解
清除, 体内半衰期可长达几周。尤其重要的是它几乎没有酶学和免疫学活性, 与具
20 有生物学活性的目的蛋白偶联不会引起副作用。因此, HSA 可以作为稳定的, 惰性的
天然载体, 在体内传输治疗性分子。有研究表明, 与 HSA 偶联的目的蛋白在动物
体内的稳定性增加 20-40 倍, 并主要经肝脏清除, 降低对肾脏的毒害作用。成熟的 HSA
长 585 个氨基酸, 含有 17 个二硫键, 由三个几乎相同的结构域组成。有实验表明,
结构域 III 可以起到整个 HSA 的作用。因此, 本研究选取结构域 III 中的 403-427 位
25 上的 25 个氨基酸残基作为构建中的 interlinker。人免疫球蛋白铰链区 IgG3'CL hinge:
人免疫球蛋白铰链区具有半胱氨酸, 其天然空间结构形成时易于通过二硫键将抗体的
两条重链连接到一起。人 IgG3'CL 铰链区具有两个半胱氨酸共 17 个氨基酸。该序
列的长度以及半胱氨酸的数目对构建三特异抗体较为适宜, 本研究采用人 IgG3'CL
中的铰链区 17 个氨基酸残基序列, 将构建的三特异抗体连接成为环形。[参考文献:
30 1. 黄华梁, 基因工程抗体, 单克隆抗体通讯, 1991, 7 (3): 1-4; 2. 刘喜富, 黄华梁,

- 基因工程抗体研究进展, 生物工程进展, 1994, 14 (1): 54; 3.黄华梁, 人源化抗体, 小分子抗体与肿瘤治疗, 单克隆抗体通讯, 1993, 9 (3): 19; 4. Slavik,J.M.,Hutchcroft,J.E.&Bierer,B.E.(1999): CD28/CTLA-4 和 CD80/CD86 家族, 信号和功能 (CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families,signaling and function). 免疫学研究 (Immunologic Research). 19/1:1-24; 5. Demanet C, Brissinck J, Leo O 等 : BCL1 淋巴瘤的双特异性抗体-介导的免疫治疗: 多注射和 CD28-诱导的共刺激的增加的效果 (Bispecific antibody-mediated immunotherapy of the BCL1 lymphoma:increased efficacy with multiple injections and CD28-induced costimulation). 血液(Blood) 1996; 87: 4390-4398; 6. Bohlen H, Manzke O , Titzer S 等:用 CD3×CD19 双特异性抗体, CD28 单特异性抗体, 和自身 T 细胞治疗的严重合并的免疫缺陷小鼠中的 EB 病毒诱导的人淋巴瘤的预防 (Prevention of Epstein-Barr virus-induced human B-cell lymphoma in severe combined immunodeficient mice treated with CD3×CD19 bispecific antibodies,CD28 monospecific antibodies, and autologous T cells). 癌症研究(Cancer Res.)1997; 57: 1704-1709; 7. Renner C, Jang W,Sahin U 等 科学(Science) 1994; 264:833-835;8. Mazzoni A, Mezzanzanica D, Jung G 等: CD3-CD28 共刺激作为在卵巢癌的双特异性单克隆抗体治疗中避免 T 细胞预活化的工具(CD3-CD28 costimulation as a means to avoiding T cell preactivation in bispecific monoclonal antibody-based treatment of ovarian carcinoma). Cancer Res. 1996;56:5443-5449;9. Manzke,O., Berthold, F, Huebe, K.等(1999): CD3×Cd19 双特异性抗体和 CD28 二价抗体增强 T 细胞抗儿科 B-全骨髓中的自身白血病细胞的反应性(CD3×Cd19 bispecific antibodies and CD28 bivalent antibodies enhance T-cell reactivity against autologous leukemic cells in pediatric B-All bone marrow). 国际癌症杂志(Int. J. Cancer), 80:715-722;10. Grosse-Hovest L,Brandl M, Dohlsten M 等 : (Int. J. Cancer) 1999;80:138-144;11. Boulianne,G.L.,Hozumi,N. & Shulman, M.J. (1984): 生产功能嵌合的鼠/人抗体(Production of functional chimeric mouse/human antibody). Nature. 312, 643-646; 12. Neuberger,M.S., Williams,G.T. & Fox,R.O. (1984): 具有新的效应器功能的重组抗体(Recombinant antibodies possessing novel effector functions). Nature 312,604-608;13. Jones, P.T.,Dear,P.H., Foote,J.等 (1986): 用来自鼠的互补决定区代替人抗体中的互补决定区(Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse). Nature, 321,522-525; 14. Riechmann,L., Clark, M., Waldmann, H.等(1988): 用于治疗的重构人抗体(Reshaping human antibodies for

- therapy). *Nature*, 332, 323-327; 15. Fay TN, Jacobs I, Teisner B. 等(1988): 从羊膜液分离两个胎儿抗原(FA-1 和 FA-2)和子宫内膜蛋白 (PP12 和 PP14); 在胎儿和母体组织中的初步观察 (Two fetal antigens (FA-1 and FA-2) and endometrial proteins (PP12 and PP14) isolated from amniotic fluid; preliminary observations in fetal and maternal tissues. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol ,29(1):73-85; 16. Tutt A, Stevenson GT, Glennie MJ(1991): 通过 TCR/CD3 复合物和 CD2 的协同信号活化和重新定位休止细胞毒 T 细胞的三特异 F(ab')₃ 衍生物 (Trispecific F(ab')₃ derivatives that use cooperative signaling via the TCR/CD3 complex and CD2 to activate and redirect resting cytotoxic T cells). 免疫学杂志(J Immunol) 147(1):60-9; 17. Jung G, Freimann U, Von Marschall Z, 等(1991): 用二和三特异性抗体片段的靶细胞诱导的 T 细胞活化(Target cell-induced T cell activation with bi- and trispecific antibody fragments). 欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol) 21(10):2431-5; 18. French RR,(1998): 产生二特异性和三特异性 F(ab)₂ and F(ab)₃ 抗体衍生物 (Production of bispecific and trispecific F(ab)₂ and F(ab)₃ antibody derivatives). 分子生物学方法(Methods Mol Biol), 80:121-134; 19. Somasundaram C, Sundarapandiyan K, Keler T, 等,(1999): 定向两个不同的肿瘤相关抗原到骨髓效应器细胞上的 CD64 的三特异性抗体偶联物的开发(Development of a trispecific antibody conjugate that directs two distinct tumor-associated antigens to CD64 on myeloid effector cells). 人抗体(Hum Antibodies), 9(1):47-54; 20. Schoonjans R, Willems A, Schoonooghe S, 等(2000a): Fab 作为产生重组双特异性和三特异性抗体衍生物的有效杂二聚支架 (Fab chains As an efficient heterodimerization scaffold for the production of recombinant bispecific and trispecific antibody derivatives). J Immunol ,165(12):7050-7; 21. Schoonjans R, Willems A, Grooten J, 等,(2000b): 重组双特异性和三特异性抗体的有效杂二聚合 (Efficient heterodimerization of recombinant bi- and trispecific antibodies). 生物分离 (Bioseparation), 9 (3):179-83; 22. Wong WM, Vakis SA, Ayre KR, 等,(2000): 类风湿性关节炎 T 细胞响应于针对 CD2, CD3 和 CD28 的新型 三特异性抗体的刺激产生 Th1 细胞因子 (Rheumatoid arthritis T cells produce Th1 cytokines in response to stimulation with a novel trispecific antibody directed against CD2, CD3, and CD28). Scand J Rheumatol, 29(5):282-7; 23. Schott ME, Frazier KA, Pollock DK,等,(1993): 合成交联的多价抗肿瘤抗体片段的制备, 表征, 和体内生物分布特征(Preparation, characterization, and in vivo biodistribution properties of synthetically cross-linked multivalent antitumor

antibody fragments). 生物偶联物化学(Bioconjug Chem), 4(2):153-65)。

卵巢癌发病率居妇科恶性肿瘤的第二位。由于起病隐匿，临床发现多属晚期，且术后易复发，五年存活率仅为 30%。敏感的早期诊断和术后残留病灶的尽早清除，是改善预后的重要环节。因此，该环形三特异抗体在卵巢癌的免疫治疗上的应用有着广阔前景。

发明概述

本发明的一个方面是提供一种用基因工程技术构建及表达的具有独特设计，低毒，高效，生产工艺简单等特点的，导向治疗肿瘤的生物制剂---抗人肿瘤×改形抗人 CD3×改形抗人 CD28 V_H 环状单链三特异抗体。

本发明的另一个方面是提供一种用于构建通用的环状单链三特异抗体的表达载体。

本发明的又一个方面是提供一种含有用于构建通用的环状单链三特异抗体的表达载体的宿主细胞。

本发明的又一个方面是提供一种编码所述的环状单链三特异抗体的核苷酸序列。

另外，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它方面对本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

附图简要说明

图 1. 构建及表达抗肿瘤环状单链三特异抗体的流程图。

图 2. 抗肿瘤环状单链三特异抗体(anti-tumor scFv×anti-CD3 scFv×anti-CD28V_H)各基因及其域间连接肽接头基因的连接结构图。

图 3. 二种改形抗 CD28 V_H 单域抗体基因的核苷酸序列及所编码的氨基酸序列。

图 4. 各种连接肽接头的核苷酸序列及所编码的氨基酸序列。

图 5. 重叠 PCR 过程示意图。

图 6. 抗肿瘤环状单链三特异抗体的通用表达质粒 pTRI 的物理图谱。

图 7. 抗卵巢癌环状单链三特异抗体在 pTRI 表达的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

图8. 大肠杆菌表达的抗卵巢癌环状单链三特异抗体的Western 印迹结果。左图：

Lane 1: pTMF 空载体上清; Lane2:三特异抗体上清 .右图: lane1 : 三特异抗体上清 (400ug/ml) ; lane2 : 三特异抗体上清(40ug/ml); lane3 : 三特异抗体上清(4ug/ml)。

图 9. 抗卵巢癌环状单链三特异抗体与 CD28 抗原的 ELISA 结果, 图中的对照为
5 空载体 pTMF 上清, TRI 为三特异抗体上清。

图 10. 抗卵巢癌环状单链三特异抗体与卵巢癌细胞膜抗原及 CD3 抗原的 ELISA 结果, 图中的 PTMFSKOV 为空载体 pTMF 上清与卵巢癌细胞膜抗原的反应, TRISKOV 为三特异抗体与卵巢癌细胞膜抗原的反应, PTMFJUR 为空载体 pTMF 上清与 Jurkat 细胞膜抗原的反应, TRIJUR 为三特异抗体与 Jurkat 细胞膜抗原的反应。

10 图 11. 抗卵巢癌环状单链三特异抗体对卵巢癌细胞的体外杀伤活性 (OCCD3CD28: 抗卵巢癌单链抗体 + 抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体, OCCD3: 抗卵巢癌单链抗体 + 抗 CD3 抗体, TRI: 环状单链三特异抗体, 对照: 未加抗体, VectorCK: 空载体上清)。

图 12. 抗卵巢癌环状单链三特异抗体的花环试验照片。

15

发明详述

抗体分子具有两条相同的重链和轻链, 每一条链由一个可变区(variable region) 和一个或多个恒定区(constant region)组成, 可变区主要负责与抗原结合, 恒定区主要负责结合效应分子。在每一个可变区内有三个在序列和晶体结构上都高度变化的
20 柔性环区(loop), 它们主要负责抗原的识别, 被称为互补决定区(complementarity-determining regions, CDRs), 而可变区的其余部分相对稳定, 由较为刚性的 β -折叠(β -sheet) 组成, 支撑着, 被称为框架区(framework regions, FRs), CDRs 与 FRs 间隔排列而形成“三明治”结构。在本发明中, 所使用的一些术语具有如下的含义:

“Fab 抗体”是指由 Fd 段(重链 V_H +CH1 构成)和完整的轻链组成, 二者通
25 过一个链间二硫键连接, 形成异二聚体, 它是完整抗体分子的三分之一, 仅有一个抗原结合位点。

“单链抗体 (scFv)”是用基因工程构建的一种抗体片段, 由抗体重链可变区 (V_H) 和轻链可变区(V_L)通过一连接肽连接而成的重组蛋白, 约为完整抗体分子的六分之一。

30 “单域抗体”是由抗体重链可变区 (V_H) 或轻链可变区(V_L)构成, 这种抗体只

有一个结构域构成，故称为单域抗体，它是完整抗体分子的十二分之一。

“最小识别单位 (Minimal recognizing unit, MRU)”是由单个 CDR 构成，约为完整抗体分子的七十分之一或八十分之一。

“改形抗体(Reshaping antibody)”也叫做 CDR 移植抗体(CDR-grafted antibody)。
5 用基因合成或定点突变的方法将鼠源 CDRs 置换人源抗体中的 CDRs，从而保留鼠源抗体的抗原结合特异性。但在构建时要考虑人源 FRs 中某些氨基酸残基会影响鼠源 CDRs 构成的抗原结合部位的构象，因此需对 FRs 中个别氨基酸残基进行突变，才能获得既具有高亲和力又最大程度上达到人源化的抗体。

本发明提供了一种抗人肿瘤的环状单链三特异抗体，它是由抗肿瘤的 Fab、单
10 域抗体或单链抗体，改形抗人 CD3 的 Fab、单域抗体或单链抗体以及改形抗人 CD28 的 Fab、单域抗体或单链抗体连接而成的。

在本发明的环状单链三特异抗体中，抗肿瘤的 Fab、单域抗体或单链抗体可以是抗卵巢癌的 Fab、单域抗体或单链抗体。

本发明的环状单链三特异抗体最好是由抗肿瘤的单链抗体，改形抗人 CD3 的
15 单链抗体，改形抗人 CD28 的单域抗体连接而成的。

在本发明的环状单链三特异抗体中，所述的改形抗人 CD28 的单域抗体最好是 V_H ，它最好具有如下两种氨基酸序列中的一种：

20 Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T
L S L T C T V S G F S L S D Y G
V H W V R Q P P G K G L E W L G V
25 I W G G G T N Y N S A L M S R R V
T S S D D T S K N Q F S L K L S
S V D T A V Y Y C A R S Y Y Y S M
30 D Y W G Q G T L V T V S S

和

35 Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T
L S L T C T V S G F S L S D Y G

V H W V R Q P P G K G L E W L G V
 I W A G G G T N Y N S A L M S R R
 5 V T S S D D T S K N Q F S L K L
 S L S S V D T A V Y Y C A R D K G
 10 Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T
 V S S

在本发明的环状单链三特异抗体中，抗肿瘤的 Fab、单域抗体或单链抗体，改
 15 形抗人 CD3 的 Fab、单域抗体或单链抗体以及改形抗人 CD28 的 Fab、单域抗体或
 单链抗体之间最好有一种连接肽。所述的连接肽可以具有如下所示的氨基酸序列中
 的一种：

(1) pelb
 20
 M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
 1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCC
 TACTTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGACCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTCGG
 M A Q V K L
 25 61 ATGGCCCAGGTGAAACTG
 TACCGGGTCCACTTTGAC

(2) Gly₄Ser
 30
 G G G G S
 1 GGTGGTGGTGGTTCT
 CCACCACCACCAAGA

(3) (Gly₄Ser)₃
 35
 G G G G S G G G G S G G G G S
 1 GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT
 CCACCACCACCAAGACCACCACCACCAAGACCACCACCACCAAGA

40 (4) HUMAN-IgG-Fc
 N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
 1 AACAGCACGTACCGGGTTGTAAGCGTCCTCACCGTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC

TTGTCGTGCATGGCCCAACATTCGCAGGAGTGGCATGACGTGGTCCTGACCGACTTACCG
 K E Y K C K
 61 AAGGAATACAAATGCAAG
 TTCCTTATGTTTACGTTC
 5
 (5) HSA
 F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T P T
 1 TTCCAGAATGCGCTGCTGGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCA
 10 AAGGTCTTACGCGACGACCAAGCAATGTGGTTCTTTCATGGGGTTCACAGTTGAGGTTGA
 P V E V S
 61 CCTGTAGAGGTCTCA
 GGACATCTCCAGAGT
 15 (6) C-myc
 E Q K L I S E E D L N
 1 GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT
 CTTGTTTTTGAGTAGAGTCTTCTCCTAGACTTA
 20

本发明的环状三特异抗体最好是通过下述域间连接肽连接成环状分子的：

(1)HINGE(反向):HUMAN-IgG3'CL

25

P C R P C T H T T D G L P T K L E

(2)HINGE (正向) : HUMAN -IgG3'CL

30

E L K T P L G D T T H T C P R C P

本发明还提供了一种编码本发明的环状单链三特异抗体的核苷酸序列。

本发明还提供了一种含有上述序列的表达载体。这种表达载体可以是 pTRI。

本发明还提供了一种含有上述载体的宿主细胞。这种宿主细胞可以是大肠杆

35 菌。

本发明的环状单链三特异抗体的构建是基于双特异抗体在肿瘤免疫治疗中起主要作用的 T 细胞需要双重信号激活而设计的一种新型工程抗体，它将针对肿瘤细

胞的抗体基因与激活 T 细胞的两个主要刺激信号的改形抗体基因融合表达。不同于其它三特异抗体的构建，该结构具有以下特点：

1. 该结构为环状。三特异抗体链状分子的两端引入人抗体分子铰链区片段，它们通过形成二硫键而使单链分子变成环状。环状的形成，使分子更稳定，并使同一分子中的不同抗体与其靶向位点有更大的空间结合而相互不影响，而且有利于抗体药物在人体内的运输；
2. 三种抗体都是小分子抗体：单链抗体或单域抗体。尤其是共刺激信号 CD28 抗体为单域抗体。该结构使整个分子不会很大，分子量约为 84kDa，有利于肿瘤的治疗；
3. 负责激活 T 细胞的两种抗体，抗人 CD3 和抗人 CD28 抗体，都是经过人源化改造的改形抗体(Reshaping antibody)，消除了免疫原性；
4. 在每种抗体之间，通过特定的域间连接肽(interlinker)，使每种抗体不仅能充分折叠形成正确的空间结构，还可引入其它一些生物学功能；
5. 三种抗体连接在一条链上成一个分子，使这一分子具有三种不同的功能；
6. 该分子中针对特定肿瘤的抗体可容易地改换成针对其他肿瘤或细胞因子的抗体，从而扩大其使用范围；
7. 直接用大肠杆菌发酵生产，产物无需经体外修饰，生产工艺简化，使用方便，大大降低生产成本。

另外，本发明还涉及包括本发明的环状单链三特异抗体和药用载体的治疗或预防肿瘤的药物组合物，和本发明的环状单链三特异抗体在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途及其在治疗或预防肿瘤中的用途。

下面结合具体实施例，进一步阐明本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

25 实施例

设计合成适当大小的核苷酸片段，通过重叠PCR扩增得到部分域间连接肽的基因序列。将该序列插入到质粒pUC19中构成新载体pUHM1。从含有抗卵巢癌的双特异抗体质粒中用XhoI,BamHI双酶切得到双特异抗体基因并且将该基因插入到克隆载体pUHM1中,得到载体pUHM2。将含有改形抗CD28单域抗体基因和含有连接肽的

基因插入到表达载体pTMF中,构成表达载体pTCH1。然后将pUHM2中含有抗卵巢癌双特异抗体及部分连接肽的序列插入到pTCH1中,构成表达质粒pTRI。用构建好的表达质粒pTRI转化宿主细胞BL21。挑取鉴定后的阳性克隆菌转接到含卡那霉素50ug/ml的LB中,37℃培养至OD₅₅₀为0.4-0.5时,向培养物中加入终浓度为0.8mmol/L的IPTG,诱导培养4小时。收集表达产物,超声破碎菌体,12000rpm离心10min,上清及沉淀分别进行8%和12% SDS-PAGE电泳和Western印迹。另外,还进行了环状单链三特异抗体的免疫学活性测定,体外杀伤活性测定和花环实验等各种活性测定。具体操作流程(见附图1-6)如下:

一. 克隆载体 pUMH1 的构建:

本克隆载体由质粒 pUC19 改建而来,将含有 5'-HindIII-pelB-Human IgG3'CL hinge(反向)-Gly₄Ser-XhoI-BamHI-Gly₄Ser-HSA-Gly₄Ser-NdeI-EcoRI-3'的连接肽片段插入到 pUC19 的 HindIII, EcoRI 双酶切位点中而构成。

设计合成 6 个大小不同的核苷酸片段,

P1: 5'-CCCAAgCTTATgAAATACCTATTgCCTACggC-3' 32nts

P2: 5'-GCCCAGGTGAAACTGCCGTGCCGTCCATGTACTCACACCACTGACGGTCTGCCGACCAAATTGGAA

GGTGGTGGTGGTTC-3' 80nts

P3: 5'-CTGCTGGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCCTGTAGAGGTCTCAGGTGG

TGGTGGTTCAT-3' 81nts

RE1: 5'-CCggAATTCCATATgAgAACCACCACCACC - 3' 30nts

RE2: 5'-TTCTTGGTGTAACGAACCAGCAGCGCATTCTGGAAAGAACCACCACCACCGGATCCCTCGAGAGAACC

ACCACCACCTTCC -3' 81nts

RE3: 5'-GGCACGGCAGTTTCACCTGGGCCATGGCTGGTTGGGCAGCGAGTAATAACAATCCAGCGGCTGCCGTA

GGCAATAGGTATT-3' 81nts

采用重叠 PCR 将 6 个片段扩增得到 285bp 的核苷酸片段。

1. 重叠 PCR 扩增连接肽核苷酸序列

重叠 PCR 采取两步扩增获得全长片段，操作见重叠 PCR 过程示意图图 5。第一步获得 P1,P2,RE3,RE2 的 PCR 双链产物 M1 以及 P3,RE1 的 PCR 补平双链片段 M2；第二步将所得到的两个片段 M1,M2 等摩尔加入，通过重叠 PCR 获得全长。1). M1 的获得：将 P1,P2,RE3,RE2 各个片段溶液 4ul(约为 10pmol)加入到离心管中，分别加入 10×PCR Buffer 3ul,4ul dNTPs (2.0mmol/l each),1ul pfu DNA 聚合酶 (3u/ul),用 ddH₂O 补足到总体积到 30ul,加入 100ul 液体石蜡，混匀，进行 30 轮 PCR 循环：94℃变性 1min., 55℃退火 30 秒，72℃延伸 40 秒。PCR 产物进行 2.5%琼脂糖凝胶电泳，利用华舜琼脂糖凝胶 DNA 回收 Kit,回收所需的 DNA 片段。2). M2 的获得：将 P3,RE1,两个片段溶液 4ul(约为 10pmol)加入到离心管中，分别加入 10×PCR Buffer 3ul,4ul dNTPs (2.0mmol/l each),1ul pfu DNA 聚合酶 (3u/ul),用 ddH₂O 补足到总体积到 30ul,加入 100ul 液体石蜡，混匀，进行 30 轮 PCR 循环：94℃变性 1min., 60℃退火 30 秒，72℃延伸 40 秒。PCR 产物进行 2.5%琼脂糖凝胶电泳，利用华舜琼脂糖凝胶 DNA 回收 Kit,回收所需的 DNA 片段。3). 全长 PCR 产物的获得：将 M1,M2 各个片段溶液 10ul 加入到离心管中，分别加入 P1,RE1 各 4ul, 10×PCR Buffer 3ul,4ul dNTPs(2.0mmol/l each),1ul pfu DNA 聚合酶 (3u/ul),用 ddH₂O 补足到总体积到 30ul,加入 100ul 液体石蜡，混匀，进行 30 轮 PCR 循环：94℃变性 1min., 55℃退火 30 秒，72℃延伸 40 秒。PCR 产物进行 2.5%琼脂糖凝胶电泳，利用华舜琼脂糖凝胶 DNA 回收 Kit,回收所需的全长 DNA 片段。

20

2. PCR 扩增产物的限制性内切酶消化及纯化

用 HindIII 和 EcoRI 对 PCR 全长 DNA 进行消化：取约 1ug DNA 片段在 40ul 反应体系中 (1×Buffer M,30u 的 HindIII 和 30u 的 EcoRI)，37℃酶解 4 小时，1%琼脂糖凝胶电泳检测消化完全后，在长波长紫外灯下切胶回收所需的条带，参照华舜生物技术有限公司产品 kit 说明，用柱回收和纯化所需的酶切片段。

25

3. 载体质粒 pUC19 的提取

采用碱法小量提取质粒：挑取 pUC19/DH5 α 单菌落，在 5ml LB 培养液(含 Amp 100ug/ml)中 37℃培养过夜，12000rpm 离心 1 分钟收集菌体。沉淀悬于 100ul Solution I (50mmol/l Glucose,10mmol/l EDTA,25mmol/l Tris pH8.0),充分混匀。加入 200ul 新配

30

制的 Solution II(0.2mol/l NaOH, 1% SDS),盖紧管盖, 快速颠倒 4-5 次, 将离心管置于冰浴中放置 3 分钟。加入 150ul 预冷的 Solution III (3mol/l KAc, pH4.8),混匀后与冰浴放置 5 分钟。4℃,12000rpm 离心 10 分钟, 转移上清至另一离心管中, 加入 2 倍体积的预冷无水乙醇, 室温放置 10 分钟, 然后 4℃, 12000rpm 离心 20 分钟。DNA 沉淀用 70%乙醇洗一遍, 待 DNA 干燥后, 将其溶于 100ul ddH₂O 中(含 RNase 50ug/ml), 37℃消化 1 小时。加入等体积的酚: 氯仿 (1: 1), 震荡混匀, 室温, 12000rpm 离心 5 分钟。转移水相至另一离心管中, 加入等体积的氯仿/异戊醇 (24: 1) 震荡混匀, 室温, 12000rpm 离心 5 分钟。转移上清至另一离心管中, 加入 1/10 体积的 NaAc(3mol/l,pH5.2),2 倍体积的无水乙醇, 4℃放置 1 小时。4℃, 12000rpm 离心 20 分钟, 弃上清, DNA 沉淀用 70%乙醇洗一遍, 干燥后沉淀溶于 25ul ddH₂O。

4. 载体质粒 pUC19 的限制性内切酶消化及纯化

用 HindIII 和 EcoRI 对载体 DNA 进行消化: 取 1ug 质粒 pUC19 在 40ul 反应体系中 (1×Buffer M,30u 的 HindIII 和 30u 的 EcoRI), 37℃酶解 4 小时, 1%琼脂糖凝胶电泳检测消化完全后, 在长波长紫外灯下切胶回收所需的条带, 参照华舜生物技术有限公司产品 kit 说明, 用柱回收和纯化所需片段。

5. DNA 的连接反应

取回收的双酶切 pUC19 约 40ng,双酶切 PCR 全长片段 20ng, 加入 2ul 10×T₄ DNA 连接酶缓冲液, 1ul T₄ DNA 连接酶 (约 20u) ,加 ddH₂O 至总体积 20ul,混匀, 16℃连接过夜。

6. 感受态细胞的制备

用氯化钙制备大肠杆菌的感受态细胞: 挑取 LB 平板上的野生 Top10 单菌落, 接种于 3ml LB 液体培养基中, 37℃震荡培养过夜。以 1%的接种量转接于 30ml 的 LB 液体培养基中, 37℃震荡培养至 OD 值为 0.3-0.4 时, 将菌液置于冰浴中 10 分钟, 4℃, 4000rpm 离心 10 分钟, 弃去上清, 沉淀溶于 20ml 预冷的 0.1mol/l CaCl₂ 中, 冰浴放置 30 分钟, 4℃, 4000rpm 离心 10 分钟, 弃去上清, 加入 2ml 预冷的 0.1mol/l CaCl₂ (含 20%甘油) 重悬细胞, 以 200ul 分装。未及时使用的各管于-70℃保存。

7. 重组 DNA 的转化, 阳性克隆的筛选及测序鉴定

10ul 连接混合物加入到 200ul 的感受态细胞中, 混匀, 冰浴放置 30 分钟, 42℃ 水浴 90 秒, 立即置于冰浴中 5 分钟, 涂布于 LB(含 100ug/ml Amp.)的平板上, 表面干燥后, 37℃倒置培养过夜。挑取平板上生长的单菌落, 采用碱法小量提取质粒, 5 分别用 HindIII, EcoRI 双酶切; 以 P1,RE1 片段为引物的 PCR 鉴定插入外源片段的质粒。将鉴定后的质粒送生工生物工程公司测序鉴定, 鉴定后测序正确的阳性质粒为 pUMH1。

二. 克隆载体 pUMH2 的构建:

10 载体 pUMH2 是由质粒 pUMH1 在 XhoI,BamHI 位点插入以人 IgG1 CH2 中 Fc 片段为 interlinker 的抗卵巢癌 scFV×抗 CD3 scFv 双特异抗体 (BsAb) 片段构成。PALM-Fc 质粒是本实验室构建的含有抗卵巢癌 scFV×抗 CD3 scFv 双特异抗体 (BsAb) 基因的中间载体, 该双特异抗体片段的顺序为: -XhoI-抗 Ovarian carcinoma VH-(Gly₄Ser)₃-抗 Ovarian carcinoma VL-Fc-抗 CD3VL-(Gly₄Ser)₃-抗 CD3VH-BamHI-。

15

1. 双特异抗体片段的制备及纯化

采用碱法小量提取质粒 pALM-Fc, 用 XhoI 和 BamHI 对载体质粒 DNA 进行消化: 取约 1ug 质粒 pALM-Fc 在 40ul 反应体系中 (1×Buffer M,30u 的 XhoI 和 30u 的 BamHI), 37℃酶解 4 小时, 1%琼脂糖凝胶电泳检测消化完全后, 在长波长紫外 20 灯下切胶回收所需的条带, 参照华舜生物技术有限公司产品 kit 说明, 用柱回收和纯化所需片段。

2. 载体质粒 pUMH1 的限制性内切酶消化及纯化

用 XhoI 和 BamHI 对载体 DNA 进行消化: 取 1ug 质粒 pUMH1 在 40ul 反应体 25 系中 (1×Buffer M,30u 的 XhoI 和 30u 的 BamHI), 37℃酶解 4 小时, 1%琼脂糖凝胶电泳检测消化完全后, 在长波长紫外灯下切胶回收所需的条带, 参照华舜生物技术有限公司产品 kit 说明, 用柱回收和纯化所需片段。

3. DNA 的连接反应, 重组 DNA 的转化, 阳性克隆的筛选

30 取回收的双酶切 pUMH1 约 40ng,双酶切双特异抗体片段 20ng, 加入 2ul 10×T₄

DNA 连接酶缓冲液, 1ul T₄ DNA 连接酶 (约 20u), 加 ddH₂O 至总体积 20ul, 混匀, 16℃连接过夜。10ul 连接混合物加入到 200ul 的感受态细胞中, 混匀, 冰浴放置 30 分钟, 42℃水浴 90 秒, 立即置于冰浴中 5 分钟, 涂布于 LB(含 100ug/ml Amp.)的平板上, 表面干燥后, 37℃倒置培养过夜。挑取平板上生长的单菌落, 采用碱法小量提取质粒, 分别采用 HindIII, EcoRI 双酶切; XhoI, BamHI 双酶切鉴定插入的外源片段。鉴定后的阳性质粒为 pUMH2。

三. 环状单链三特异抗体的构建与表达:

环状单链三特异抗体是由表达载体 pTCH1 和含有域间连接肽的双特异抗体克隆载体 pUMH2 提供的片段构建而成。pTCH1 是由表达载体 pTMF 插入: -NdeI-(anti-CD28VH)-(c-myc)-Gly₄Ser-Human IgG3'CL(17Aa, 正向)-BamHI-片段后构成。

1. 表达质粒 pTCH1 的构建

采用碱法小量提取含有 -NdeI-(anti-CD28 VH)-(c-myc)-Gly₄Ser-Human IgG3'CL(17Aa, 正向)-BamHI-片段的质粒 pUC19, 取约 1ug 该质粒加入到 40ul 反应体系中 (1×Buffer M, 30u 的 BamHI 和 30u 的 NdeI), 37℃酶解 4 小时, 用于制备 -NdeI-(anti-CD28VH)-(c-myc)-Gly₄Ser-Human IgG3'CL(17Aa, 正向)-BamHI-片段; 在同样条件下用 NdeI 和 BamHI 水解表达载体 pTMF。1%琼脂糖凝胶电泳检测消化完全后, 在长波长紫外灯下切胶回收所需的条带, 参照华舜生物技术有限公司产品 kit 说明, 用柱回收和纯化所需片段。

取回收的双酶切 pTMF 约 40ng, 双酶切的 anti-CD28 VH 片段 20ng, 加入 2ul 10×T₄ DNA 连接酶缓冲液, 1ul T₄ DNA 连接酶 (约 20u), 加 ddH₂O 至总体积 20ul, 混匀, 16℃连接过夜。10ul 连接混合物加入到 200ul 的大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 混匀, 冰浴放置 30 分钟, 42℃水浴 90 秒, 立即置于冰浴中 5 分钟, 涂布于 LB(含 50ug/ml Kna.)的平板上, 表面干燥后, 37℃倒置培养过夜。挑取平板上生长的单菌落, 采用碱法小量提取质粒, 分别采用质粒大小; HindIII, NdeI 双酶切鉴定插入的外源片段。鉴定后的阳性质粒为 pTCH1。

2. 表达质粒 pTCH1 的限制性内切酶消化及纯化

用 HindIII 和 NdeI 对载体 DNA 进行消化: 取 1ug 质粒 pTCH1 在 40ul 反应体系中 (1×Buffer M, 30u 的 HindIII 和 30u 的 NdeI), 37℃酶解 4 小时, 1%琼脂糖凝

胶电泳检测消化完全后，在长波长紫外灯下切胶回收所需的条带，参照华舜生物技术有限公司产品 kit 说明，用柱回收和纯化所需片段。

3. 含有域间连接肽双特异抗体片段的制备及纯化

- 5 采用碱法小量提取质粒 pUMH2，用 HindIII 和 NdeI 对质粒 DNA 进行消化：取约 1ug 质粒 pUMH2 在 40ul 反应体系中（1×Buffer M,30u 的 HindIII 和 30u 的 NdeI），37℃酶解 4 小时，1%琼脂糖凝胶电泳检测消化完全后，在长波长紫外灯下切胶回收所需的条带，参照华舜生物技术有限公司产品 kit 说明，用柱回收和纯化所需片段。

10

4. DNA 的连接反应, 重组 DNA 的转化, 阳性克隆的筛选

- 取回收的双酶切 pTCH1 约 40ng,双酶切的含有域间连接肽双特异抗体片段 20ng，加入 2ul 10×T₄ DNA 连接酶缓冲液，1ul T₄ DNA 连接酶（约 20u），加 ddH₂O 至总体积 20ul,混匀，16℃连接过夜。10ul 连接混合物加入到 200ul 的感受态细胞中，
15 混匀，冰浴放置 30 分钟，42℃水浴 90 秒，立即置于冰浴中 5 分钟，涂布于 LB(含 50ug/ml Kna.)的平板上，表面干燥后，37℃倒置培养过夜。挑取平板上生长的单菌落，采用碱法小量提取质粒，分别采用 HindIII,NdeI 双酶切鉴定插入的外源片段。鉴定后的阳性质粒为 pTRI (附图 6)。

20 5. 环状单链三特异抗体的表达

挑取鉴定后含有质粒 pTRI 的阳性克隆单菌落转接到含卡那霉素 50ug/ml 的 LB 中，37℃培养至 OD₅₅₀ 为 0.4-0.5 时，向培养物中加入终浓度为 0.8mmol/l 的 IPTG，诱导培养 4 小时。收集表达产物，超声破碎菌体，12000rpm 离心 10min，上清及沉淀分别进行 12%和 8% SDS-PAGE 电泳。

25

聚丙烯酰胺凝胶的配制参见下表 1：

30

表 1

	浓缩胶 5%	分离胶 12%	分离胶 8%	封口胶
30%Acr/Bis(29:1)(ml)	0.5	6.0	4.0	0.53
1.5M Tris-HCl(pH8.8)(ml)	-	3.8	3.8	-
1.0M Tris-HCl(pH6.8)(ml)	0.38	-	-	0.5
10% SDS (ml)	0.03	0.15	0.15	0.02
10% AP (ml)	0.03	0.15	0.15	0.02
TEMED (ml)	0.003	0.006	0.009	0.0012
ddH ₂ O (ml)	2.1	4.9	6.9	0.93

样品的处理：适量蛋白样品与等体积的 2×SDS 凝胶加样缓冲液（100mmol/l Tris-HCl
5 pH6.8, 200mmol/l DTT, 4%SDS,0.2%溴酚蓝，20%甘油）混合，沸水浴加热 5 分钟，待上样。

电泳：电泳缓冲液 25mmol/l Tris-HCl,pH8.3, 0.1%SDS。取适量体积的样品上样，恒压 60V，待样品进入分离胶，恒压 120V。

10 染色及脱色：采用考马斯亮兰 R250 染色（0.25g 考马斯亮兰 R250 溶于 100ml 甲醇-水-冰乙酸溶液中（90ml 甲醇：水（1：1，v/v）和 10ml 冰乙酸），室温染色 6-12 小时。用甲醇-水-冰乙酸溶液脱色，室温脱色至具有明显条带，照相，结果参见附图 7。

Western 印迹：上述 SDS-PAGE 分离的样品用 Bio-Rad Mighty Small Transphor 装置中在转移缓冲液（39mmol/L 甘氨酸，40mmol/L tris 碱，0.03% SDS，20%甲醇）100V
15 转移 1 小时，将转印后的膜放入封闭液中封闭两小时(封闭液：5%脱脂牛奶溶解于 TBS 中(TBS: 100 mmol/L Tris-HCL, PH=7.5, 0.9% NaCl),用 TBST(含 0.1% Tween20 的 TBS)洗三遍，每次五分钟。与 1：1000 稀释的抗 9E10 抗体小鼠腹水室温结合 1 小时，洗三次。再加入 1：1000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠抗体室温结合 1 小时，洗五遍，
20 最后在底物显色液中（6 mg/ml DAB, 1% H₂O₂）显色 5-15 分钟，拍照。图 8 示在分

子量 84kDa 处出现的特异条带。

四. 环状单链三特异抗体的活性测定

1 环状单链三特异抗体的免疫学活性测定

- 5 超声破碎法制备的 Jurkat 细胞膜抗原、卵巢癌细胞株 SKOV3 的细胞膜抗原，CD28 纯抗原分别包被 ELISA 板 4℃ 过夜，用含 0.05% Tween20 的 PBST 洗板三次，加 200ul 1% 的 BSA 封闭 2 小时，洗三次。与可溶的环状三特异抗体超声上清结合 1 小时，洗三次。加入 1: 1000 稀释的抗 9E10 抗体小鼠腹水室温结合 1 小时，洗三次。再加入 1: 1000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠抗体室温结合 1 小时，洗五遍。在底物显色液中（10 mg/ml OPD, 1% H₂O₂）显色后，96 孔酶标仪测定 OD₄₉₀。图 9 和图 10 分别显示，表达产物三特异抗体保持了所含有的三种抗体的免疫活性，可与卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞膜、CD3(Jurkat 细胞膜)和 CD28 纯抗原特异地反应。

2 环状单链三特异抗体的体外杀伤活性测定

- 15 PBMCs(外周血单核细胞淋巴细胞)由 Ficoll 密度梯度离心方法制备。巨噬细胞和单核细胞经由玻璃 37℃ 吸附 2 小时去除。SKOV3 靶细胞铺于 96 孔培养板上，37℃，5% CO₂ 温箱中孵育过夜形成细胞单层。效应细胞（PBMCs）以一定的效靶比加入各孔，同时加入不同稀释倍数的抗体，总体积为 250ul（各种细胞及抗体均用完全培养基稀释）。将这个 96 孔培养板放入 37℃，5% CO₂ 温箱中孵育 3 天。RPM1640 培养基洗板两次以去除效应细胞。各孔加入 200ul RPM1640 培养基及 20ul MTT 溶液（0.5mg/ml, Sigma）继续孵育 4 小时，弃去 MTT 溶液，加入 100ul DMSO 溶液溶解所形成的 formazan，酶标仪测定 OD₄₉₀。实验设计背景孔 B（仅加培养基），加靶细胞和效应细胞的对照组 C，实验组 E，每孔均为三复孔，取其均值。%细胞死亡率=100×(C-E)/(C-B)。图 11 的结果表明，三特异抗体在体外具有很强的杀伤卵巢癌
- 20 细胞的能力，并显著高于抗卵巢癌 scFv + 抗 CD3 scFv 的实验组和抗卵巢癌 scFv + 抗 CD3 scFv + 抗 CD28 scFv 的实验组。
- 25

3 花环实验

- 胰酶消化的人卵巢癌细胞 SKOV3 离心 1,000rpm 5 分钟，重悬于完全培养基中。
- 30 每孔加入 2×10² 个 SKOV3 细胞，37℃、5% CO₂ 温箱中孵育过夜，上述方法制备的

PBMCs 加入 100 IU/ml IL-2 . 37℃活化过夜。将 PBMCs 用 RPMI1640 培养基洗涤三次，去除残余的 IL-2，按固定的效/靶比（20：1）加入到六孔培养板中。同时加入不同浓度的三特异抗体分泌上清。37℃，5% CO₂ 中孵育 2 小时后在倒置显微镜下观察花环的形成情况并拍照。图 12 和下表 2 的结果表明，2 小时开始出现花环，SKOV3 细胞周围黏附有效应细胞，4 小时 SKOV3 细胞开始裂解，10 小时绝大多数 SKOV3 细胞已经裂解。

表 2 抗卵巢癌环状单链三特异抗体的花环形成率

抗体浓度	400ug/ml	40ug./ml	4ug/ml	40ug./ml 载体	无抗体
				对照	
花环形成率	40%	30%	20%	10%	0

表中的载体对照为空载体 PTMF 上清

10

权 利 要 求 书

1. 一种抗人肿瘤的环状单链三特异抗体，它是由抗肿瘤的 Fab、单域抗体或单链抗体，改形抗人 CD3 的 Fab、单域抗体或单链抗体以及改形抗人 CD28 的 Fab、
5 单域抗体或单链抗体连接而成的。

2. 按照权利要求 1 所述的环状单链三特异抗体，其中，抗肿瘤的 Fab、单域抗体或单链抗体是抗卵巢癌的 Fab、单域抗体或单链抗体。

3. 按照权利要求 1 所述的环状单链三特异抗体，它是由抗肿瘤的单链抗体，改形抗人 CD3 的单链抗体，改形抗人 CD28 的单域抗体连接而成的。

10 4. 按照权利要求 3 所述的环状单链三特异抗体，其中，所述的改形抗人 CD28 的单域抗体是 V_H ，它具有如下两种氨基酸序列中的一种：

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T
15 L S L T C T V S G F S L S D Y G
V H W V R Q P P G K G L E W L G V
I W G G G T N Y N S A L M S R R V
20 T S S D D T S K N Q F S L K L S
S V D T A V Y Y C A R S Y Y Y S M
25 D Y W G Q G T L V T V S S

和

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T
30 L S L T C T V S G F S L S D Y G
V H W V R Q P P G K G L E W L G V
35 I W A G G G T N Y N S A L M S R R
V T S S D D T S K N Q F S L K L
S L S S V D T A V Y Y C A R D K G
40

Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T
V S S

- 5 5. 按照权利要求 1 所述的环状单链三特异抗体, 其中, 抗肿瘤的 Fab、单域抗体或单链抗体, 改形抗人 CD3 的 Fab、单域抗体或单链抗体以及改形抗人 CD28 的 Fab、单域抗体或单链抗体之间有一种连接肽。

6. 按照权利要求 5 所述的环状单链三特异抗体, 其中, 所述的连接肽具有如下所示的氨基酸序列中的一种:

10

(1) M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
M A Q V K L

15

(2) G G G G S

(3) G G G G S G G G G S G G G G S

(4) N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
K E Y K C K

20

(5) F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T P T
P V E V S

25

(6) E Q K L I S E E D L N

7. 按照权利要求 5 所述的环状单链三特异抗体, 它是通过下述域间连接肽连接成环状分子的:

P C R P C T H T T D G L P T K L E

30

或者

E L K T P L G D T T H T C P R C P

35

8. 一种编码权利要求 1 至 7 中任何一项所述的环状单链三特异抗体的核苷酸序列。

9. 一种含有权利要求 8 所述序列的表达载体。

10. 按照权利要求 8 所述的载体, 它是 pTRI。

11. 一种含有权利要求 8 或 9 中任何一项所述的载体的宿主细胞。
12. 按照权利要求10所述的宿主细胞，它是大肠杆菌。
13. 一种用于治疗或预防肿瘤的药物组合物，包括权利要求1-7中任何一项所述的环状单链三特异抗体和药用载体。
- 5 14. 权利要求13的药物组合物，其用于治疗或预防卵巢癌。
15. 权利要求1-7中任何一项所述的环状单链三特异抗体在制备用于治疗或预防肿瘤的药物中的用途。
16. 权利要求15的用途，其中的肿瘤为卵巢癌。
17. 权利要求1-7中任何一项所述的环状单链三特异抗体在治疗或预防肿瘤中的
- 10 用途。
18. 权利要求17的用途，其中的肿瘤为卵巢癌。

1/14

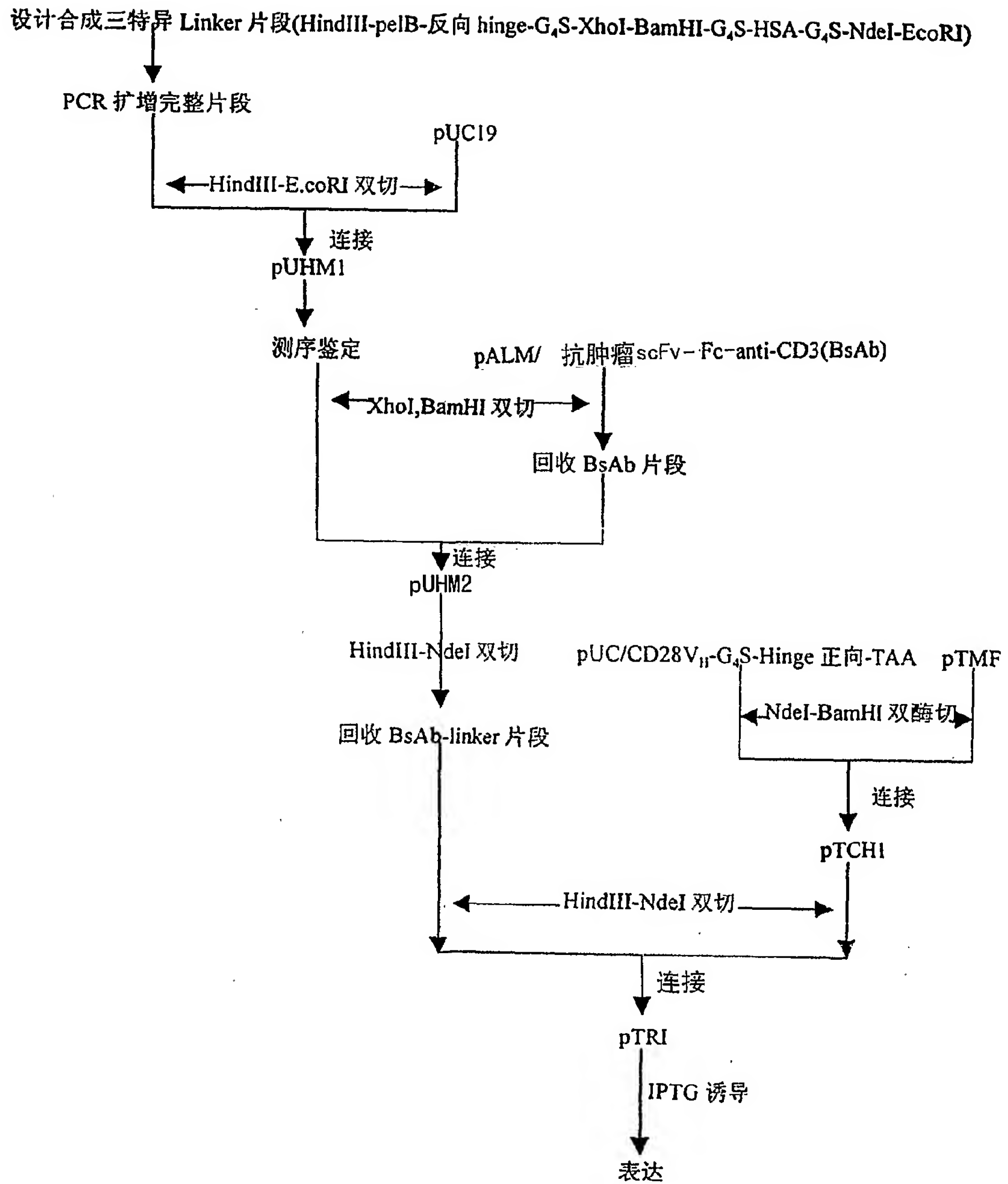


图 1

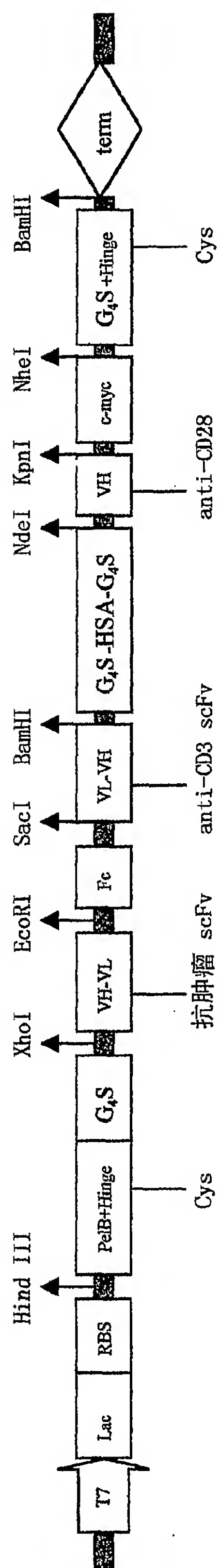


图 2

3/14

改型抗 CD28VH 单域抗体序列一：

```

      Q V Q   L Q E S   G P G   L V K   P S Q T
1  CAGGTACAGC TACAGGAATC TGGTCCGGGT CTGGTAAAAC CGTCTCAGAC
   GTCCATGTCG ATGTCCTTAG ACCAGGCCCA GACCATTTTG GCAGAGTCTG

      L S L   T C T   V S G F   S L S   D Y G
51 CCTGTCTCTG ACCTGTACCG TATCTGGTTT CTCTCTGTCT GACTATGGTG
   GGACAGAGAC TGGACATGGC ATAGACCAAA GAGAGACAGA CTGATACCAC

      V H W V   R Q P   P G K   G L E W   L G V
101 TTCATTGGGT ACGTCAGCCG CCAGGTAAAG GTCTGGAATG GCTGGGTGTA
   AAGTAACCCA TGCAGTCGGC GGTCCATTTC CAGACCTTAC CGACCCACAT

      I W G   G G T N   Y N S   A L M   S R R V
151 ATATGGGGTG GAGGCACGAA TTATAATTCTG GCTCTCATGT CCAGACGTGT
   TATACCCAC  CTCCGTGCTT AATATTAAGC CGAGAGTACA GGTCTGCACA

      T S S   D D T   S K N Q   F S L   K L S
201 AACCTCTTCC GACGATACCT CTAAAAATCA GTTCTCTCTG AAACGTGTCTT
   TTGGAGAAGG CTGCTATGGA GATTTTTTAGT CAAGAGAGAC TTTGACAGAA

      S V D T   A V Y   Y C A   R S Y Y   Y S M
251 CCGTAGACAC CGCTGTATAC TATTGTGCTC GTTCCTATTA CTATTCTATG
   GGCATCTGTG GCGACATATG ATAACACGAG CAAGGATAAT GATAAGATAC

      D Y W   G Q G T   L V T   V S S
301 GACTACTGGG GTCAGGGCAC CCTGGTAACC GTATCTTCC
   CTGATGACCC CAGTCCCGTG GGACCATTGG CATAGAAGG

```

改型抗 CD28VH 单域抗体序列二：

```

      Q V Q   L Q E S   G P G   L V K   P S Q T
1  CAGGTACAGC TACAGGAATC TGGTCCGGGT CTGGTAAAAC CGTCTCAGAC
   GTCCATGTCG ATGTCCTTAG ACCAGGCCCA GACCATTTTG GCAGAGTCTG

      L S L   T C T   V S G F   S L S   D Y G
51 CCTGTCTCTG ACCTGTACCG TATCTGGTTT CTCTCTGTCT GACTATGGTG
   GGACAGAGAC TGGACATGGC ATAGACCAAA GAGAGACAGA CTGATACCAC

      V H W V   R Q P   P G K   G L E W   L G V
101 TTCATTGGGT ACGTCAGCCG CCAGGTAAAG GTCTGGAATG GCTGGGTGTA
   AAGTAACCCA TGCAGTCGGC GGTCCATTTC CAGACCTTAC CGACCCACAT

```

图 3 (A)

4/14

I W A G G G T N Y N S A L M S R R
151 ATATGGGCTG GTGGAGGCAC GAATTATAAT TCGGCTCTCA TGTCCAGACG
TATACCCGAC CACCTCCGTG CTTAATATTA AGCCGAGAGT ACAGGTCTGC
V T S S D D T S K N Q F S L K L
201 TGTAACCTCT TCCGACGATA CCTCTAAAAA TCAGTTCTCT CTGAAACTGT
ACATTGGAGA AGGCTGCTAT GGAGATTTTT AGTCAAGAGA GACTTTGACA

S L S S V D T A V Y Y C A R D K G
251 CTCTGTCTTC CGTAGACACC GCTGTATACT ATTGTGCTCG TGACAAAGGT
GAGACAGAAG GCATCTGTGG CGACATATGA TAACACGAGC ACTGTTTCCA

Y S Y Y Y S M D Y W G Q G T L V T
301 TACTCCTATT ACTATTCTAT GGACTACTGG GGTCAGGGCA CCCTGGTAAC
ATGAGGATAA TGATAAGATA CCTGATGACC CCAGTCCCGT GGGACCATTG

V S S
351 CGTATCTTCC
GCATAGAAGG

图 3(B)

5/14

(1)pelb

M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A
1 ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCCAACCAGCC
TACTTTATGGATAACGGATGCCGTCGGCGACCTAACAATAATGAGCGACGGGTTGGTCGG
M A Q V K L
61 ATGGCCCAGGTGAAACTG
TACCGGGTCCACTTTGAC

(2)HINGE(反向):HUMAN-IgG3'CL

P C R P C T H T T D G L P T K L E
1 CCGTGCCGTCCATGTACTCACACCACTGACGGTCTGCCGACCAAATTGGAA
GGCACGGCAGGTACATGAGTGTGGTGACTGCCAGACGGCTGGTTTAACCTT

(3)Gly4Ser

G G G G S
1 GGTGGTGGTGGTTCT
CCACCACCACCAAGA

(4)(Gly4Ser)₃

G G G G S G G G G S G G G G S
1 GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT
CCACCACCACCAAGACCACCACCACCAAGACCACCACCACCAAGA

(5)HUMAN-IgG-Fc

N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G
1 AACAGCACGTACCGGGTTGTAAGCGTCCTCACCCTACTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC
TTGTCGTGCATGGCCCAACATTGCGAGGAGTGGCATGACGTGGTCCTGACCGACTTACCG
K E Y K C K
61 AAGGAATACAAATGCAAG
TTCCTTATGTTTACGTTT

(6)HSA:

F Q N A L L V R Y T K K V P Q V S T P T
1 TTCCAGAATGCGCTGCTGGTTCGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCA
AAGGTCTTACGCGACGACCAAGCAATGTGGTTCCTTTCATGGGGTTCACAGTTGAGGTGA
P V E V S
61 CCTGTAGAGGTCTCA
GGACATCTCCAGAGT

图 4 (A)

6/14

(7)C-myc

```
      E Q K L I S E E D L N
1  GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT
   CTTGTTTTTGAGTAGAGTCTTCTCCTAGACTTA
```

(8)HINGE (正向) : HUMAN-IgG3'CL

```
      E L K T P L G D T T H T C P R C P
1  GAATTGAAAACCCCGCTGGGTGACACTACCCACACTTGTCCACGTTGCCCG
   CTTAACTTTTGGGGCGACCCACTGTGATGGGTGTGAACAGGTGCAACGGGC
```

图 4 (B)

7/14

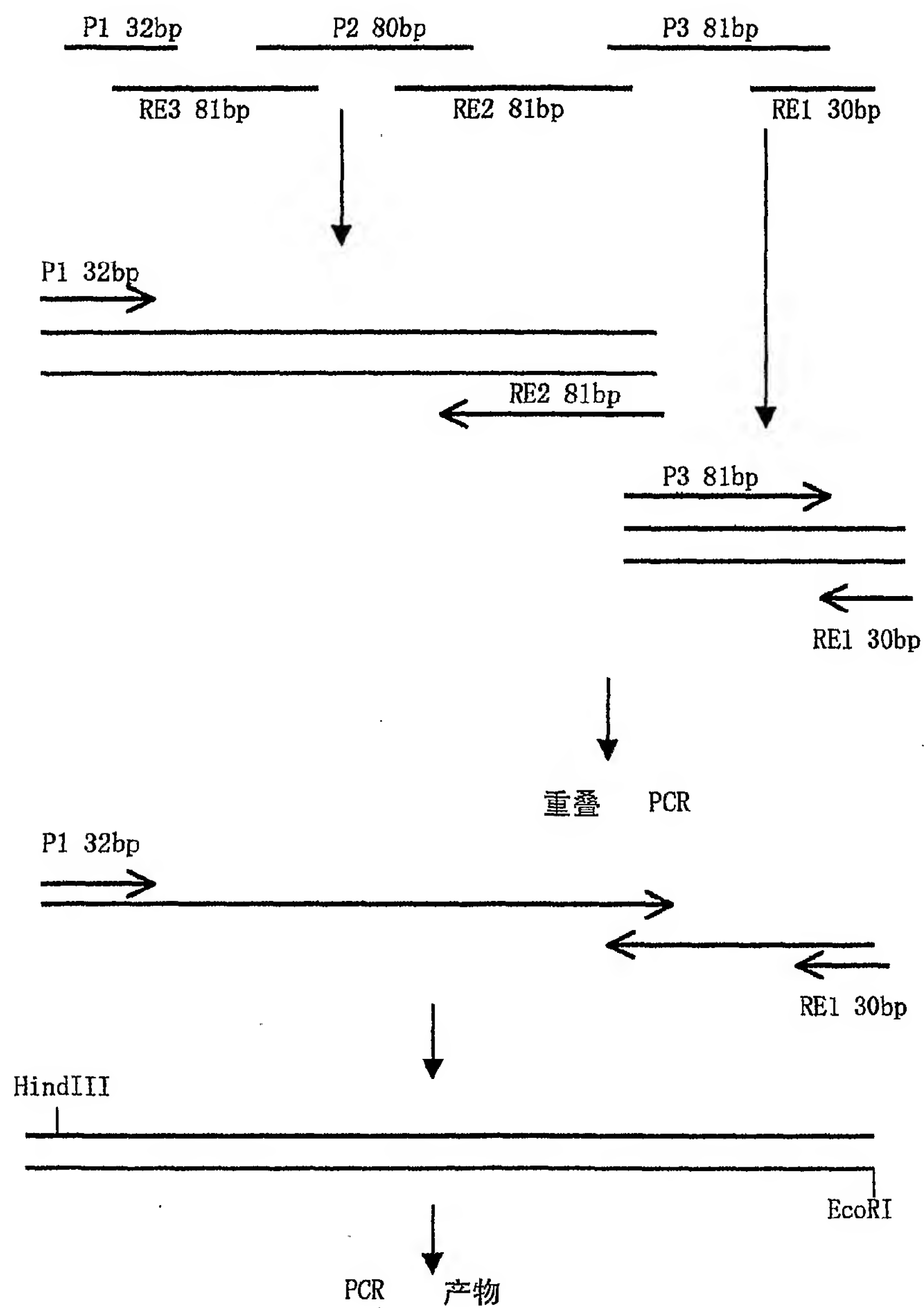


图 5

8/14

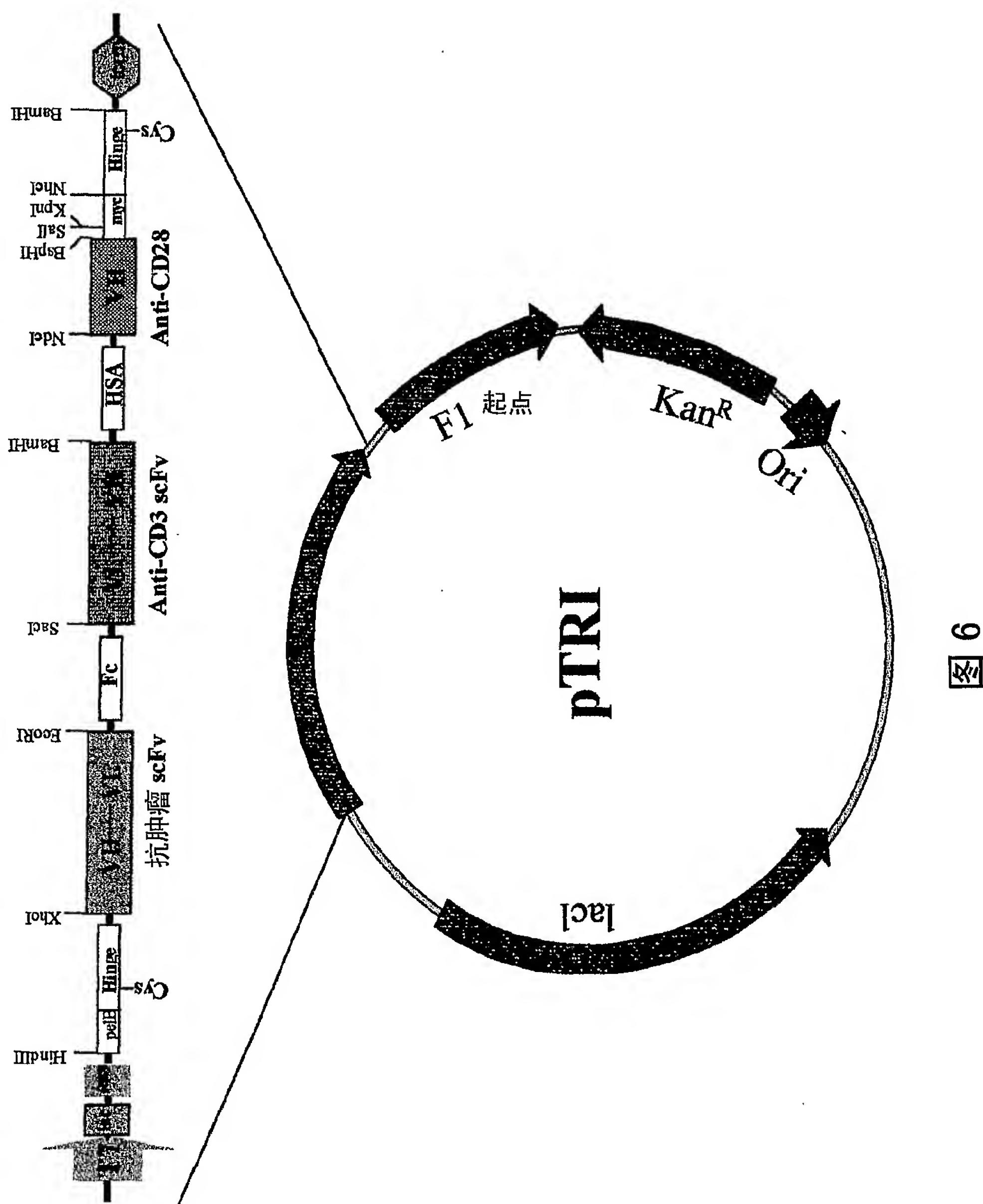


图 6

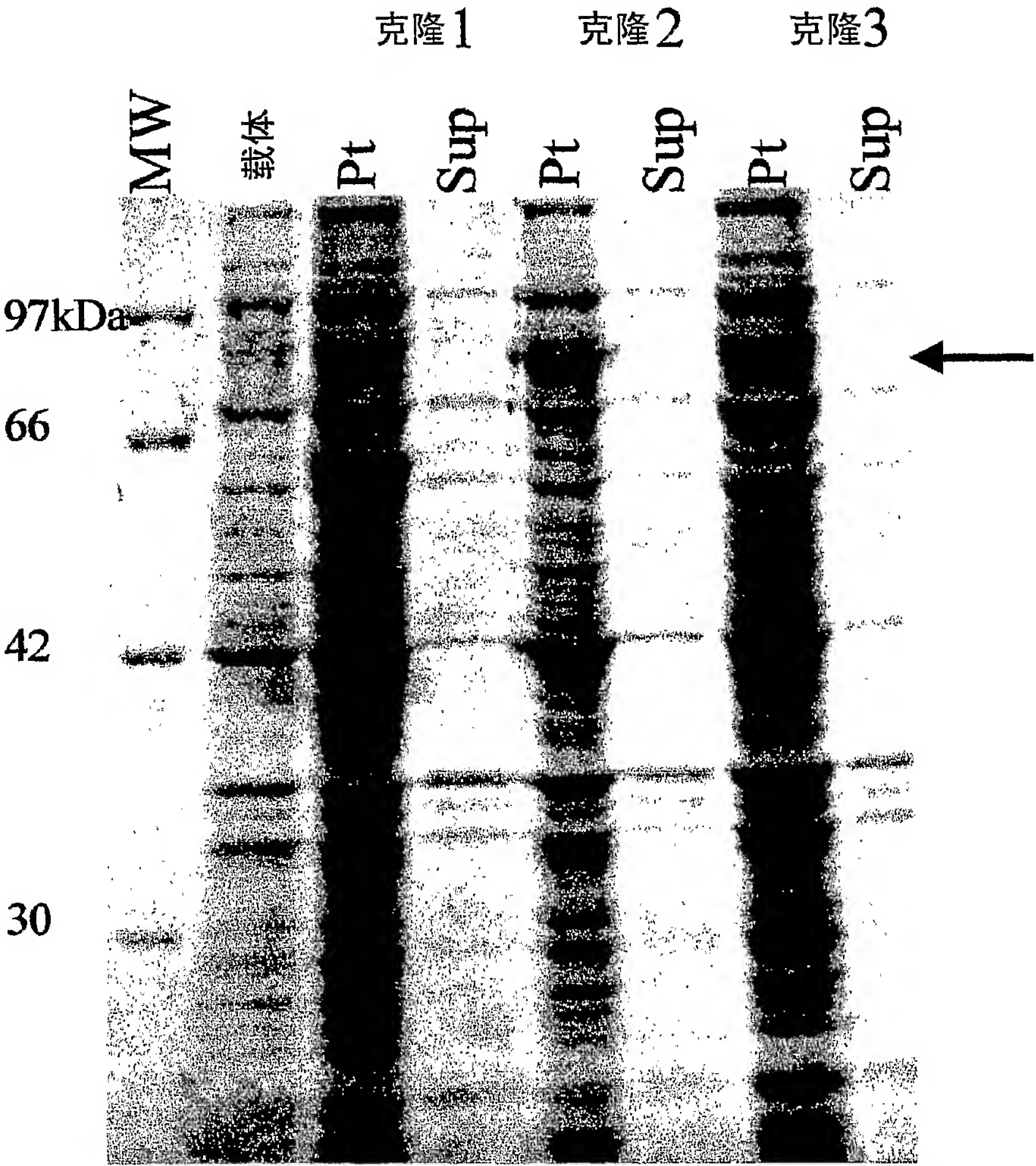


图 7

10/14

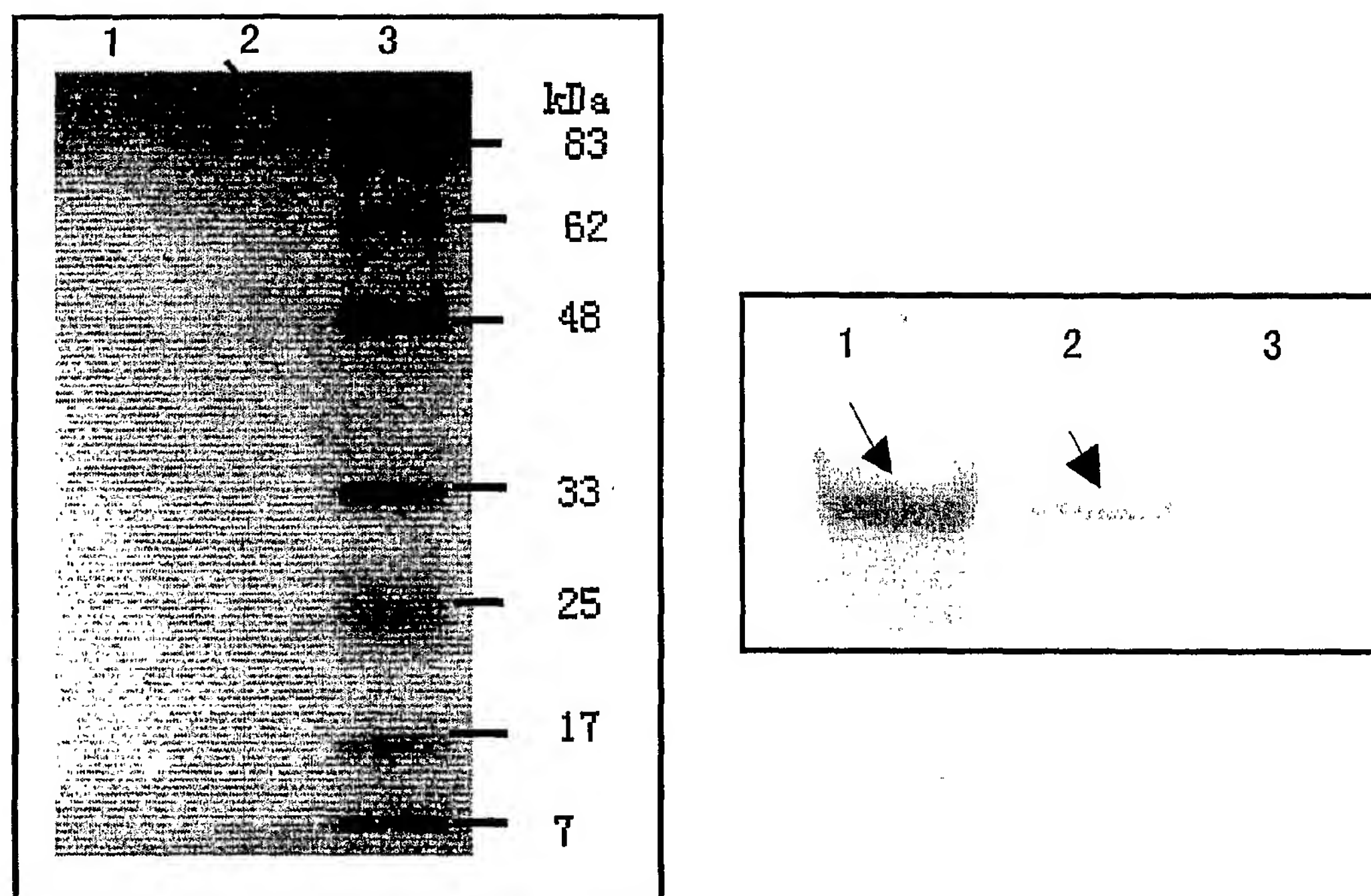


图 8.

11/14

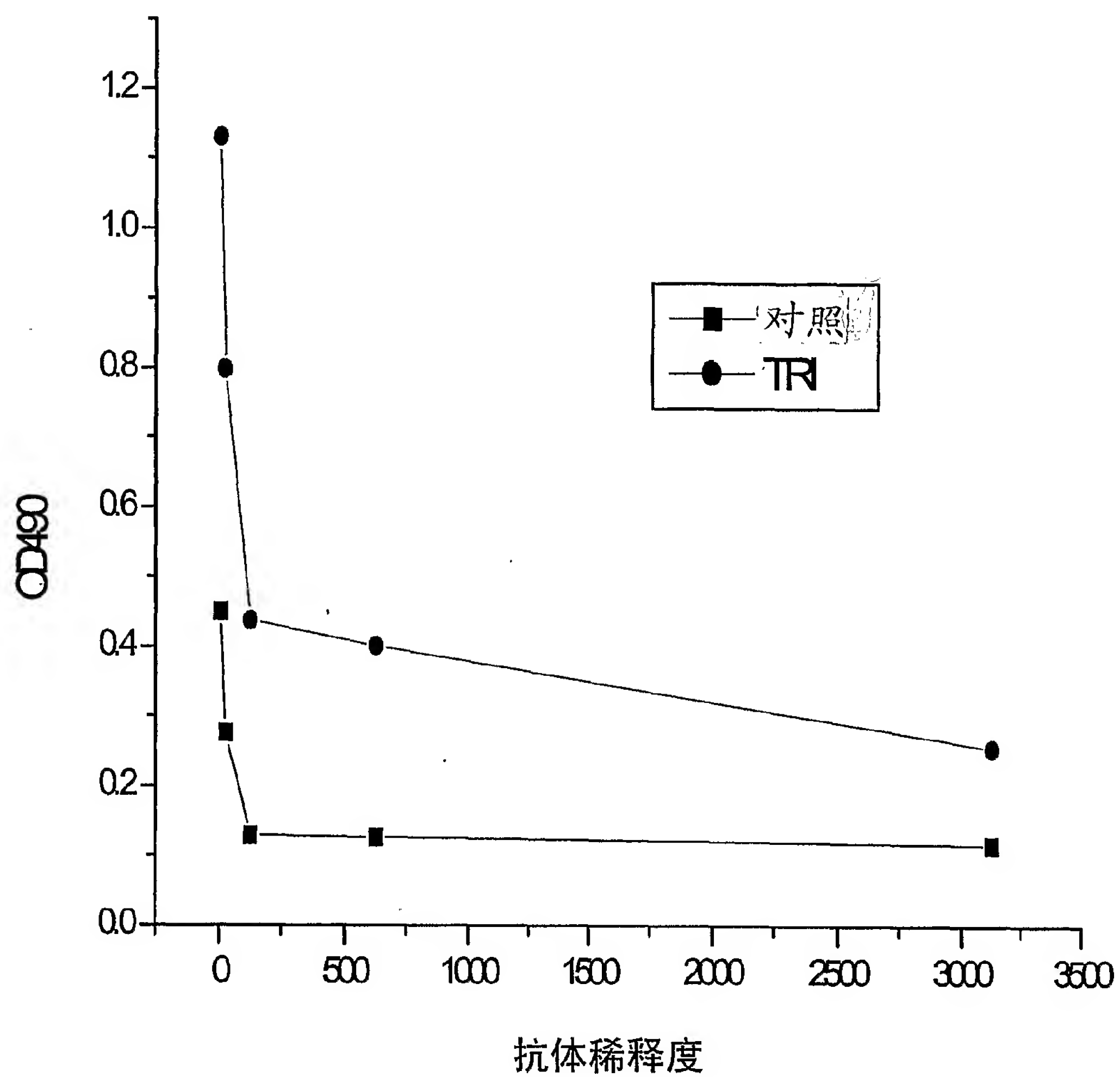


图 9

12/14

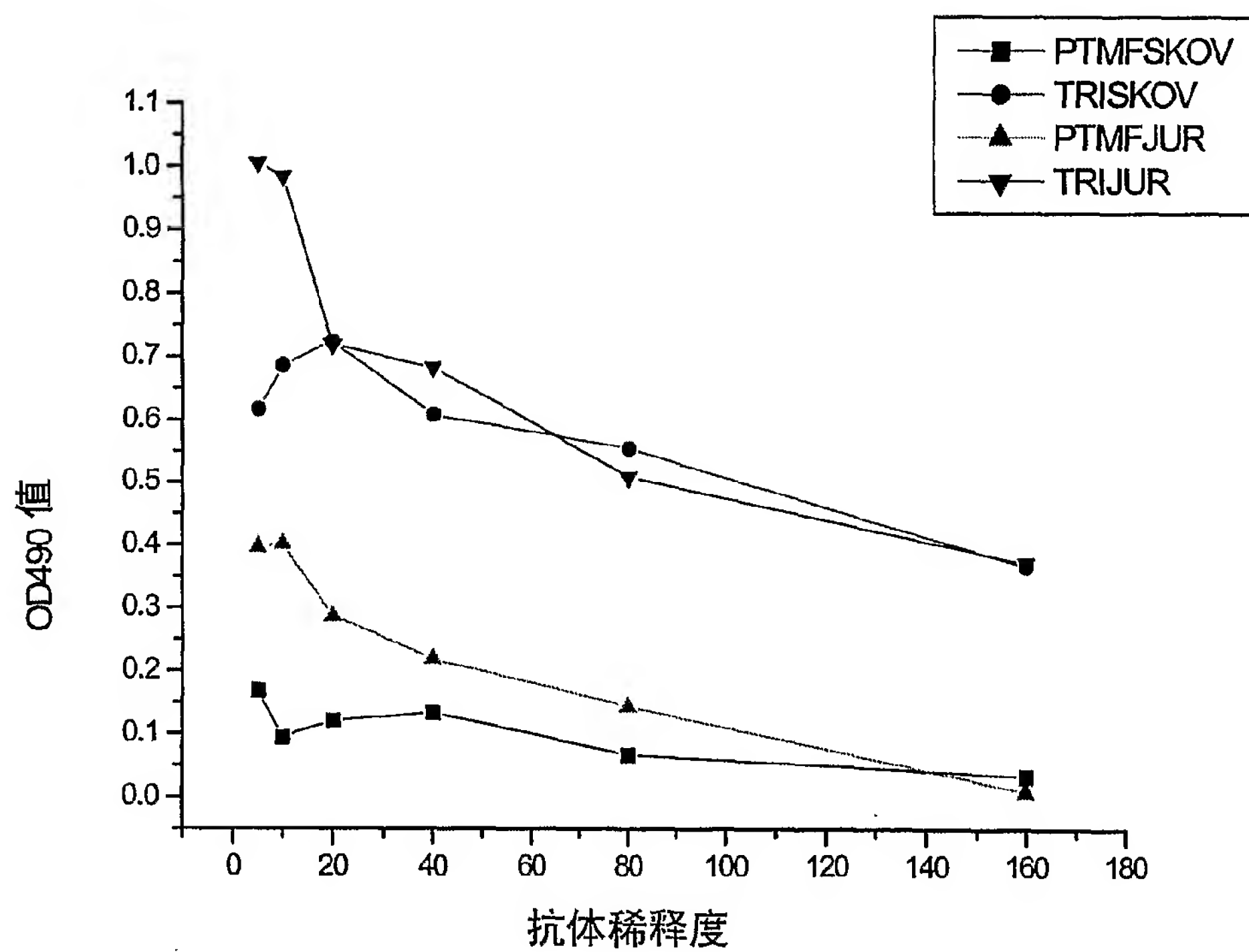


图 10

13/14

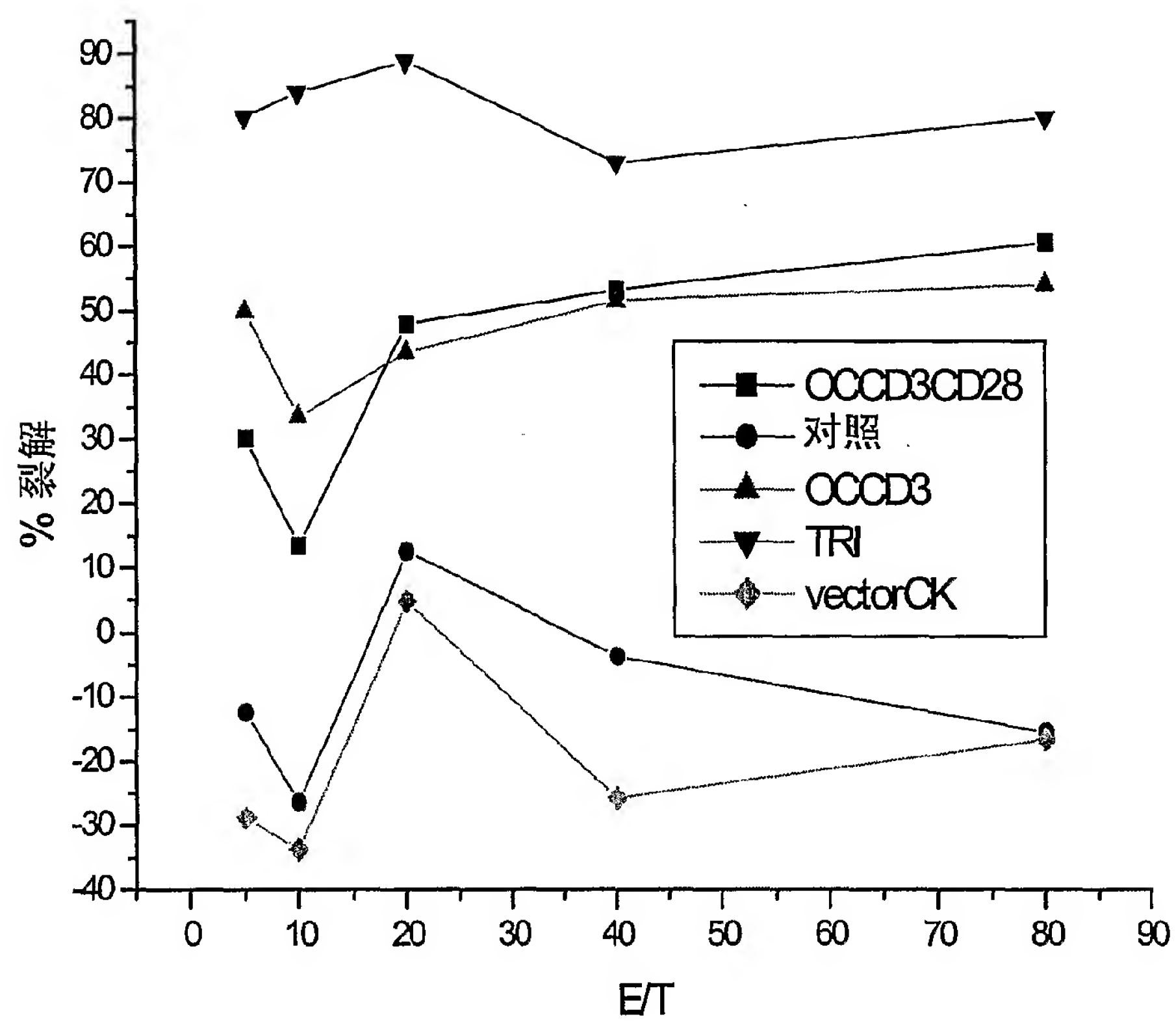
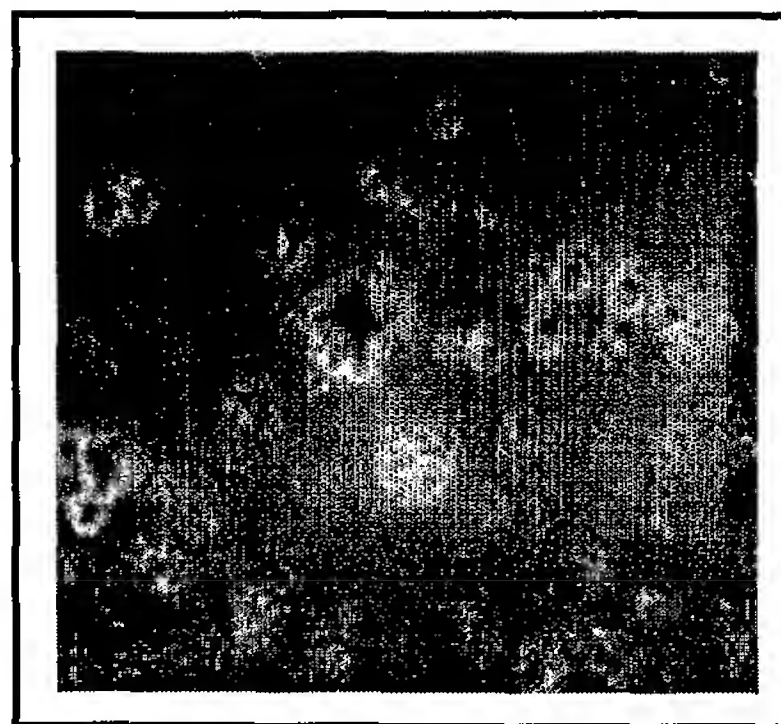
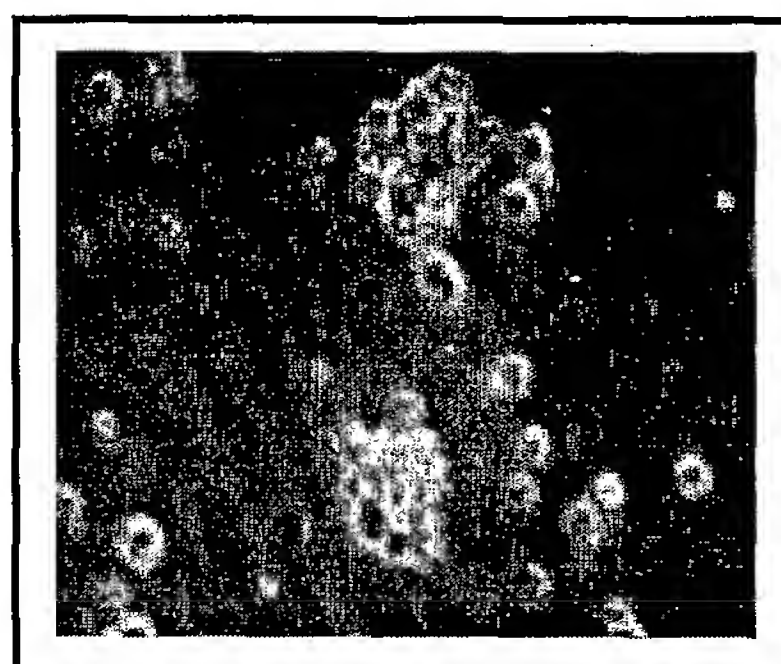


图 11

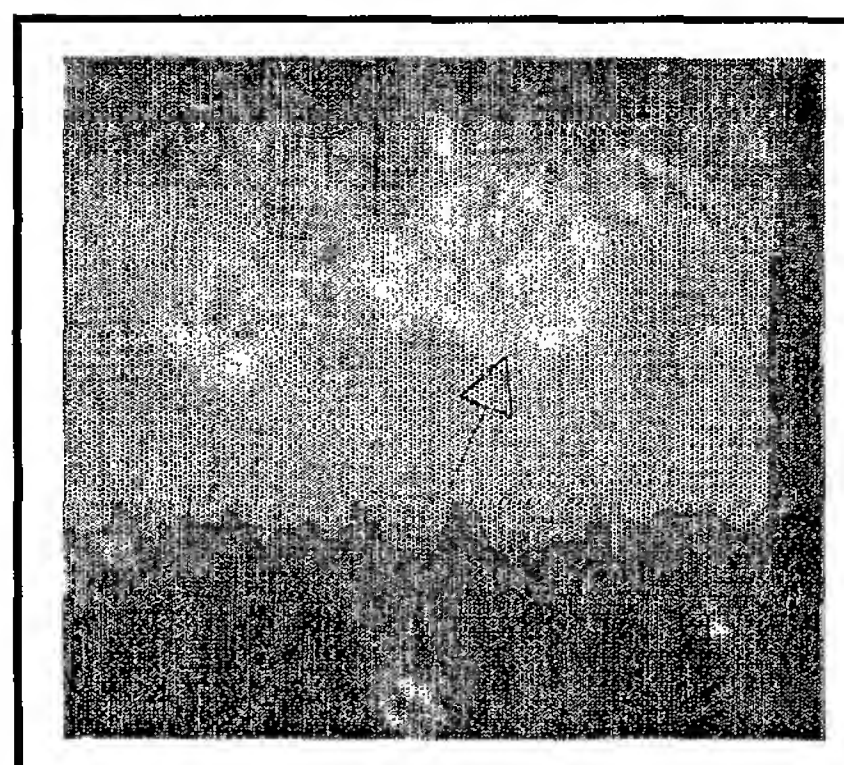
14/14



2小时



4小时



10 小时

图 12

序列表

<110> 中国科学院遗传研究所
北京安波特基因工程有限公司

<120> 环状单链三特异抗体

<130> IP02008

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met Ser
50 55 60

Arg Arg Val Thr Ser Ser Asp Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Tyr
85 90 95

Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Met
50 55 60

Ser Arg Arg Val Thr Ser Ser Asp Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Leu Ser Ser Val Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Lys Leu
20 25

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 6
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 6

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
1 5 10 15

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
20 25

<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 7

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val
1 5 10 15

Ser Thr Pro Thr Pro Val Glu Val Ser
20 25

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 8

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 9

Pro Cys Arg Pro Cys Thr His Thr Thr Asp Gly Leu Pro Thr Lys Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 10

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 10

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys
1 5 10 15

Pro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00252**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****IPC⁷ C07K16/18, A61K39/395, C12N15/13, A61P35/00**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ C07K, C12N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

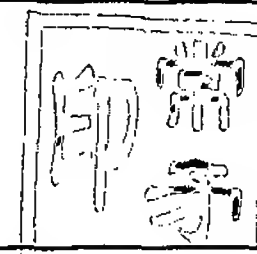
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A1,0018806(LINDHOFER, Horst[DE/DE]) 6 April 2000, See the whole document.	1-16
A	EP, B1, 0885614(GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT & GESUNDHEI) 16 April 1998, See the whole document.	1-16
A	US5601819(The General Hospital Corporation) 11 February 1997, See the whole document.	1-16
A	WO,A1,9103493 21 March 1991, See the whole document.	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
10 July 2002Date of mailing of the international search report
08 AUG 2002Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451Authorized officer
CHANG, mao
Telephone No. 86-10-62093906

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN02/00252**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos: 17, 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Methods for the diagnosis or for the treatment of diseases.
2. ☐ Claims Nos:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

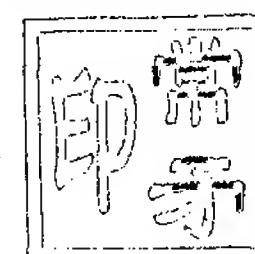
PCT/CN02/00252

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date
WO0018806	2000-04-06	DE19859115 EP1115427	2000-03-30 2001-07-18
EP0885614	1998-12-23	JP11071288 DK885614T	1999-03-16 2000-12-04
US5601819	1997-02-11	NONE	
WO9103493	1991-03-21	AU6290090	1991-04-08

国际检索报告

 国际申请号
PCT/CN02/00252

A. 主题的分类		
IPC ⁷ C07K16/18, A61K39/395, C12N15/13, A61P35/00		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)		
IPC ⁷ C07K, C12N, A61K, A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)		
WPI, EPODOC, PAJ, CNPAT		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	WO,A1,0018806(赫斯特公司[德国/德国]) 2000 年 4 月 6 日, 见全文。	1-16
A	EP,B1,0885614(GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT) 1998 年 6 月 16 日, 见全文。	1-16
A	US5601819(The General Hospital Corporation) 1997 年 2 月 11 日, 见全文。	1-16
A	WO, A1, 9103493(南安普顿大学[英国/英国]) 1991 年 3 月 21 日, 见全文。	1-16
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的专用类型: “A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利 “L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理 “X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性 “&” 同族专利成员的文件		
国际检索实际完成的日期 2002 年 7 月 10 日		国际检索报告邮寄日期 08. 8月 2002 (08. 08. 02)
国际检索单位名称和邮寄地址 ISA/CN 中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088) 传真号: 86-10-62019451		授权官员 常 矛 电话号码: 86-10-62093906



国际检索报告

国际申请号
PCT/CN02/00252

第I栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第 1 页第 1 项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

- 1.
- ☒
- 权利要求(编号): 17,18

因为它们涉及到不要求本国际检索单位检索的主题, 即:
疾病的诊断和治疗方法。

- 2.
- ☐
- 权利要求(编号):

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以至于不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

- 3.
- ☐
- 权利要求(编号):

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第II栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第 1 页第 2 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

- 1.
- ☐
- 由于申请人按时缴纳了所要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

- 2.
- ☐
- 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求都进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

- 3.
- ☐
- 由于申请人仅按时缴纳了部分所要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求(编号):

- 4.
- ☐
- 申请人未按时缴纳所要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首先提到的发明;
-
- 包含该发明的权利要求是(编号):

关于异议的说明: ☐ 申请人的异议书随附加检索费同时提交。☐ 支付附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利成员的情报国际申请号
PCT/CN02/00252

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
WO0018806	2000-04-06	DE19859115	2000-03-30
		EP1115427	2001-07-18
EP0885614	1998-12-23	JP11071288	1999-03-16
		DK885614T	2000-12-04
US5601819	1997-02-11	无	
WO9103493	1991-03-21	AU6290090	1991-04-08